

# **Biokonversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol mit freien und immobilisierten Mikroorganismen**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr.rer.nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Ralf Bock  
aus Braunschweig

1. Referent: Prof. Dr. Klaus-Dieter Vorlop  
2. Referent: apl. Prof. Dr. Siegmund Lang  
eingereicht am: 16.10.2003  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 22.01.2004

Januar 2004

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht.

## **Publikationen**

VORLOP K-D, WILLKE T, BOCK R, KOSCHIK I, SCHLIEKER M, WELTER K, WITTLICH P (2001) Biotechnologisch hergestellte Polymer-Ausgangsstoffe. Gülzower Fachgespräche 16:68-80

SCHLIEKER M, BOCK R, KOSCHIK I, WITTLICH P, VORLOP K-D (2001) Konversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol mit freien und immobilisierten Zellen von *C. butyricum* NRRL B-1024. SchrR Nachwachsende Rohstoffe 18:591-597

BOCK R, VORLOP K-D, BAGANZ K, ZAHN W (2002) Biokonversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol als alternative Nutzung eines Nebenproduktes. Freiburger Forschungshefte : Reihe A, Verfahrenstechnik, Umwelttechnik A866:125-132

SCHLIEKER M, BOCK R, KOSCHIK I, VORLOP K-D (2003) Bildung von 1,3-Propandiol aus Rohglycerin mit neuen Mikroorganismen. SchrR Nachwachsende Rohstoffe 22:515-522

## **Tagungsbeiträge**

KOSCHIK I, BOCK R, WITTLICH P, VORLOP K-D (2001) Conversion of glycerol to 1,3-propanediol by newly isolated bacterial strains. 10th European Congress on Biotechnology 'Biotechnology Challenges in the new Millenium' : Madrid (Spain), 8-11 July 2001.

VORLOP K-D, WILLKE T, BOCK R, KOSCHIK I, SCHLIEKER M, WELTER K, WITTLICH P (2001) Biotechnologisch hergestellte Polymer-Ausgangsstoffe. NAROSSA : 7th International Conference for Renewable Resources : Magdeburg, 11-12 June 2001

WITTLICH P, BOCK R, SCHLIEKER M, KOSCHIK I, VORLOP K-D (2001) Biokonversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol mit freien und immobilisierten Mikroorganismen. Innovationsforum Wertschöpfungsketten in der Naturstoffverarbeitung : Gardelegen, 10.-11. Dezember 2001

BOCK R, KOSCHIK I, SCHLIEKER M, WITTLICH P, VORLOP K-D (2002) Production of 1,3-propanediol with immobilized microorganisms. COST 840 and X International BRG Workshop on Bioencapsulation 'Cell Physiology and Interactions of Biomaterials and Matrices' Prag, Tschechische Republik, 26-28 April 2002

HIRSCHMANN S, SCHLIEKER M, BOCK R, BAGANZ K, KOSCHIK I, VORLOP K-D (2003) Bioconversion of the renewable resource glycerol to 1,3-propanediol. 11th European Congress on Biotechnology, Basel, Schweiz 24.-29. August 2003



# Symbole und Abkürzungen

## Abkürzungen

---

3-HPA	3-Hydroxipropionaldehyd
ADP	Adenosin-Di-Phosphat
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
BTM	Biotrockenmasse
<i>c</i>	Konzentration
DSMZ	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und
FAL	Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft
GC	Gaschromatographie
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
HE	Hefeextrakt
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> ,
k.A.	keine Angabe(n)
MinS	Mineralsalzmedium
	MinS <sup>66</sup> N <sup>10</sup> PG <sup>50</sup> bezeichnet ein mit 66 mM (9,09 g · L <sup>-1</sup> ) Phosphat
	gepuffertes Mineralsalzmedium (MinS) mit einem
	Stickstoffgehalt (N) von 10 mM (0,535 g · L <sup>-1</sup> ) und einem
	Pharmaglyceringehalt von 50 g · L <sup>-1</sup>
n.n.	nicht nachweisbar
NADH <sub>2</sub>	Nicotinamid-Dinukleotid
NRRL	<i>Northern Regional Research Laboratory</i>
OD	Optische Dichte, Extinktion
PD	1,3-Propandiol
PG	Pharmaglycerin, Reinglycerin 99,5 %
ppm	<i>parts per million</i> , mg je kg
PTT	Polytrimethylenterephthalsäure
PVA	Polyvinylalkohol
RCM	<i>reinforced clostridia medium</i>
RG	Rohglycerin
RI	<i>refraction index</i> , Brechungsindex
RME	Rapsölmethylether, Biodiesel
RT	Raumtemperatur
SL	Spurenelementelösung
T	Transmission
TU	Technische Universität

## Indizes

---

605 nm	Optische Messung bei einer Wellenlänge von 605 nm
aq.	in wässriger Lösung

## Definitionen

durchschnittliche Produktivität [ $P_{PD}$ ]:

Die durchschnittliche Produktivität wird in dieser Arbeit definiert als die gebildete 1,3-Propandiolmenge pro Volumen und Zeit, wobei der gesamte Zeitraum ab Animpfen bis zum Erreichen der Endkonzentration betrachtet wird. Bei den Experimenten im Schüttelkolben bzw. Vial wird die durchschnittliche Produktivität ( $P_{PD}$ ) als die zwischen Animpfen und Probenahme gebildete 1,3-Propandiolmenge pro Volumen und Zeit definiert.

maximale Produktivität:

Die maximale Produktivität gibt die maximale gebildete 1,3-Propandiolmenge pro Volumen und Zeit zwischen zwei Messwerten an.

Ausbeute [ $Y_{PD}$  (w/w)]:

Als Ausbeute wird in dieser Arbeit die Masse an gebildetem 1,3-Propandiol [kg] bezogen auf die Masse an verbrauchtem Glycerin [kg] definiert.

molare Ausbeute [ $Y_{PD}$  (m/m)]:

Die molare Ausbeute bezeichnet die auf die Stoffmenge [mol] bezogene Menge an 1,3-Propandiol die pro verbrauchtem Mol Glycerin bebildet wurde.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Zielsetzung der Arbeit .....	3
3	Grundlagen – Theoretischer Hintergrund .....	5
3.1	1,3-Propandiol .....	5
3.1.1	Herstellung von 1,3-Propandiol.....	5
3.1.2	Anwendungen von 1,3-Propandiol.....	12
3.2	Glycerin .....	13
3.2.1	Anwendungen von Glycerin .....	13
3.2.2	Gewinnung von Glycerin.....	14
4	Material und Methoden .....	25
4.1	Verwendete Kulturmedien, Lösungen und Chemikalien .....	25
4.1.1	Mineralsalzmedium .....	25
4.1.2	Spurenelementelösung zu DSMZ-Medium 144 .....	26
4.1.3	Bereitung anaerober Medien .....	27
4.2	Immobilisierung der Mikroorganismen .....	28
4.2.1	Immobilisierung in linsenförmige Gele auf Basis von PVA – LentiKats® ...	28
4.2.2	Herstellung von LentiKats® .....	28
4.2.3	Herstellung von LentiKats® mit dem LentiKat®Printer .....	28
4.3	Mikroskopische Untersuchungen.....	29
4.3.1	Freie Zellen.....	29
4.3.2	Immobilisierte Zellen.....	29
4.4	Bestimmung der Zellzahl .....	30
4.5	Bestimmung der Optischen Dichte .....	30
4.6	Messung der Biotrockenmasse (BTM).....	30
4.7	Verwendete Mikroorganismen .....	31
4.7.1	<i>Clostridium butyricum</i> NRRL B-1024 .....	31
4.7.2	IK 96, IK 123, IK 124.....	32
4.8	Stammhaltung .....	33
4.8.1	<i>Clostridium butyricum</i> NRRL B-1024 .....	33
4.9	Analytik .....	33
4.9.1	HPLC .....	33

4.9.2	GC .....	34
4.10	Verwendete Fermentersysteme.....	36
4.10.1	1-Liter-Massstab .....	36
4.10.2	Umbau des 1-Liter-Fermentersystems.....	37
4.10.3	Computergesteuerter 1-Liter-Fermenter .....	41
4.10.4	Computergesteuertes 1-Liter-Doppel-Fermentersystem.....	42
4.10.5	Computergesteuertes Fermentersystem mit online HPLC.....	43
4.11	Bestimmung des Totvolumens des Probenahmesystems .....	48
4.12	Fermenterfernüberwachung via D-Netz.....	48
4.13	Regelung des Glycerinfeeds.....	49
4.14	Verwendung von Phosphat als internen Standard.....	49
4.15	Vorbereitung des 1-Liter-Fermenters.....	50
5	Experimenteller Teil .....	51
5.1	Aufnahme der Wachstumskurve.....	51
5.2	Untersuchungen zur Abhängigkeit der Überlebensrate bei der Immobilisierung vom Alter der Clostridienkultur.....	51
5.3	Untersuchungen zur Verwendbarkeit unterschiedlicher Rohglycerinwässer ..	52
5.4	Untersuchungen zum Einfluss einiger Spurenelemente auf Zellwachstum, Ausbeute und Produktivität von IK 123.....	54
5.5	Untersuchungen zur Hemmung durch Substrat und Produkte .....	55
5.5.1	Hemmung durch das Substrat Glycerin .....	55
5.5.2	Hemmung durch die Produkte .....	55
5.6	Substratlimitierung .....	56
5.7	Verwendung von Co-Substraten.....	56
5.8	Adaption von <i>Clostridium butyricum</i> NRRL B-1024 an höhere 1,3-Propandiolkonzentrationen.....	57
6	Ergebnisse und Diskussion.....	59
6.1	<i>Clostridium butyricum</i> NRRL B-1024.....	59
6.1.1	Wachstumskurve von <i>Clostridium butyricum</i> NRRL B-1024.....	59
6.1.2	Untersuchungen zur Abhängigkeit der Überlebensrate bei der Immobilisierung vom Alter der Clostridienkultur.....	61
6.1.3	Verwertbarkeit unterschiedlicher Rohglycerinwässer.....	64
6.1.4	Adaption von <i>Clostridium butyricum</i> NRRL B-1024 an höhere 1,3-Propandiolkonzentrationen .....	68



6.1.5	Veränderung der Fermentationstemperatur .....	69
6.1.6	Fermentation im 10 Liter Maßstab .....	70
6.2	Biokonversion mit dem Stamm IK 96 / IK 124 .....	71
6.2.1	Testfermentation mit dem Stamm IK 96.....	71
6.2.2	Optimierung der Fermentationstemperatur für IK 96 .....	72
6.2.3	Fermentation mit Rohglycerin (IK 124) .....	74
6.2.4	Fermentation im 200 Liter Maßstab .....	75
6.3	Biokonversionstests mit dem Stamm IK 123 .....	77
6.3.1	Wachstumskurve von IK 123 .....	77
6.3.2	Einfluss einiger Spurenelemente auf Zellwachstum, Ausbeute und Produktivität von IK 123.....	79
6.3.3	Hemmung durch Substrat und Produkte.....	87
6.3.4	Substratlimitierung .....	95
6.3.5	Verwendung von Co-Substraten.....	96
6.4	Biokonversion mit dem Stamm IK 123.....	98
6.4.1	Testfermentation mit dem Stamm IK 123.....	98
6.4.2	Erhöhung der Konzentrationen der Medienbestandteile (IK 123) .....	99
6.4.3	Zusatz von Ammoniumchlorid zum Feed.....	100
6.4.4	Batch-Fermentation mit IK 123 .....	101
6.4.5	Batch-Fermentation mit Rohglycerinwasser .....	102
6.4.6	Optimierung der Fermentationstemperatur für IK 123.....	105
6.4.7	Fed-batch-Fermentation mit Rohglycerinwasser .....	107
6.4.8	Optimierung des pH-Wertes der Fermentation IK 123.....	109
6.4.9	Optimale Biokonversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol mit IK 123 .....	110
6.4.10	Fermentationen im 10 Liter Maßstab .....	111
6.5	Aufreinigung von Rohglycerin .....	113
6.5.1	Biodiesel .....	114
6.5.2	Rapsöl.....	115
6.5.3	Anionentauscher.....	116
6.5.4	Anionen- und Kationentauscher.....	117
6.5.5	Elektrodialyse .....	118
7	Zusammenfassung und Ausblick .....	121
7.1	Immobilisierung in LentiKats® .....	121
7.2	Automatisierung eines Laborfermentersystems.....	121

7.3	Mikrobielle 1,3-Propandiol-Produktion .....	122
7.4	Verwendung von Rohglycerin .....	124
8	Literatur .....	127
9	Anhang .....	132
9.1	Schaltpläne Dasylab <sup>®</sup> : .....	135
9.2	Datentransfer von Chromgate <sup>®</sup> nach Dasylab <sup>®</sup> .....	143
9.2.1	Beispiel für eine Exportdatei der Software Chromgate <sup>®</sup> .....	143
9.2.2	Beispiel für eine Dasylab <sup>®</sup> -Datei .....	144
9.2.3	Programm zum Konvertieren der HPLC-Analyseergebnisse in das Dasylab <sup>®</sup> -Dateiformat .....	144

# 1 Einleitung

1,3-Propandiol erfreut sich seit einiger Zeit eines wachsenden Interesses. Im Zeitraum von 1993 bis 1999 stieg die weltweite Produktion von 1,3-Propandiol von 100 t/a auf über 80.000 t/a. Der Hauptgrund für diesen starken Anstieg der produzierten 1,3-Propandiol Menge ist in der Verwendung von 1,3-Propandiol als Monomer bei der Herstellung von Polytrimethylenterephthalat (PTT) zu sehen. PTT ist ein Polymer, das sich durch hervorragende elastische Eigenschaften ähnlich denen von Nylon und einer Beständigkeit gegenüber Chemikalien ähnlich der von Polyestern auszeichnet. Es ist deshalb ideal für den Einsatz im Teppichboden- und Textilbereich (CHUA 1996). Polytrimethylenterephthalat lässt sich auf herkömmlichen Anlagen der kunststoffverarbeitenden Industrie bearbeiten und ist unter dem Handelsnamen Corterra® und Sonora® auf dem Markt.

Neben der chemischen Synthese von 1,3-Propandiol ausgehend von Acrolein oder Ethylenoxid gibt es noch Verfahren, die auf der mikrobiellen Umsetzung von Glycerin zu 1,3-Propandiol basieren, wie z.B. das im Rahmen dieses Projektes untersuchte Verfahren unter Verwendung des Organismus *Clostridium butyricum*.

Die mikrobielle Umwandlung von Glycerin zu 1,3-Propandiol wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht. Dabei wurden vielfältige Erkenntnisse zum anaeroben Glycerinstoffwechsel und zu kinetischen Daten erarbeitet (BIEBL 1991, BIEBL et al. 1999, DECKWER 1995, MENZEL et al. 1997, REIMAN A et al. 1998a, SAINT-AMANS et al. 1994, TAG 1990, ZENG et al. 1996). Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Ansätze zur Steigerung der Wirtschaftlichkeit der mikrobiellen Herstellung von 1,3-Propandiol verfolgt. Durch den Einsatz gentechnischer Methoden (CAMERON et al. 1998, SKRALY 1997) sowie von Limitierungs- und Mutationsexperimenten wurde eine Erhöhung der 1,3-Propandiol-Ausbeute (BIEBL und MARTEN 1995, REIMAN A et al. 1996) und der Produkttoleranz (Abbad-Andaloussi et al. 1995, REIMAN A et al. 1998a) angestrebt. Über eine geeignete Fermentationsführung wie etwa Hochzell-dichtefermentation konnte die Produktivität bis auf  $21 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$  1,3-Propandiol gesteigert werden (REIMAN A et al. 1998b). Die Verwertung von Rohglycerinen zur Kostenreduktion wurde hingegen nur unvollständig untersucht (PETITDEMANGE et al. 1995, PAPANIKOLAOU et al. 2000, WITTLICH 2001).

Neben der Biokonversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol wird auch die 1,3-Propandiolherstellung direkt aus Zuckern durch gentechnisch veränderte Mikroorganismen untersucht. Durch Transfer der Gene eines natürlichen 1,3-Propandiolbildners, z.B. *K. pneumoniae* auf eine Glycerin produzierende Hefe oder durch Klonierung aller erforderlichen Gene in *E. coli* soll Glucose als kostengünstigerer Rohstoff für die 1,3-Propandiol Herstellung genutzt werden (CAMERON et al. 1998, POTERA 1997).

Der US amerikanische Kunstfaserhersteller Dupont arbeitet in Kooperation mit Genencor an einer Produktion des Diols auf Basis von Glucose durch Einsatz gentechnisch veränderter Mikroorganismen (GENENCOR 1998, DUPONT & GENENCOR 1998) und meldete (DUPONT 2000) den unmittelbar bevorstehenden Durchbruch bei der Nutzung gentechnisch veränderter Mikroorganismen. Ein gemeinsames Patent von Dupont und Genencor, das 2001 veröffentlicht wurde, gibt im Beispielteil Daten zu einer Fermentation mit einem gentechnisch veränderten *E. coli*. Dieser bildet aerob unter Verwendung von Vitaminen und Antibiotika auf Glucose bis zu  $129 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  1,3-Propandiol mit einer Produktivität von etwa  $1,7 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ . Die Ausbeute dieses Prozesses liegt bei 34 %, bezogen auf die eingesetzte Glukose.

Die Anfälligkeit fast aller erwähnten Fermentationsprozesse für Kontaminationen und die daraus folgende Notwendigkeit der sterilen Prozessführung sowie die geringen Produktivitäten von 5 bis  $10 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$  stellen ein Manko der biotechnologischen 1,3-Propandiolproduktion dar. Das Problem des Verstopfens der Filtermembranen, die bei der produktiveren Hochzelllichtfermentation zur Zellrückhaltung und damit Aufkonzentrierung benutzt werden (REIMANN A et al. 1998b), konnte bisher nicht gelöst werden. Die Standzeit dieses Prozesses betrug nur wenige Tage.

Die Nutzung von in linsenförmigen PVA-Hydrogelen, sogenannten LentiKats<sup>®</sup>, immobilisierten Bakterienzellen von *K. pneumoniae* (LUTZ 1999) oder *C. butyricum* (WITTLICH 2001) stellt eine gute und preiswerte Lösung für das Problem der Kontamination und zur Steigerung der Produktivität dar. Die Produktivität konnte mit dieser Immobilisierung auf  $35 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$  gesteigert werden. Der Prozess war über Monate stabil und wies eine ausgeprägte Infektionsstabilität auf.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit teilt sich in zwei Bereiche: Erstens der Optimierung der mikrobiellen 1,3-Propandiolproduktion und zweitens die Entwicklung und der Bau eines automatischen Fermentersystems mit angeschlossener online-Analytik.

Die mikrobielle Herstellung von 1,3-Propandiol aus nachwachsenden Rohstoffen ist eine mögliche Alternative zur chemischen Synthese dieses Diols. Die Wettbewerbsfähigkeit eines biotechnologischen Prozesses ist Voraussetzung für die technische Verwirklichung. Entscheidend für Konkurrenzfähigkeit eines solchen Verfahrens sind direkt oder indirekt die folgenden Gesichtspunkte:

- Verwendung eines ungefährlichen Produktionsstammes
- hohe Prozessstabilität bei geringem technischem und personellem Aufwand
- hohe Produktivität, Produktausbeute und –konzentration
- kostengünstige Aufreinigung des Produktes
- Verwendung kostengünstiger Roh- und Hilfsstoffe

Ziel dieser Arbeit war es, Fortschritte im Hinblick auf eine mögliche technische Realisierung der biotechnischen 1,3-Propandiol-Herstellung zu erzielen.

Dazu wurde die Einschlussimmobilisierung von *C. butyricum* NRRL B-1024 optimiert, da der Einsatz immobilisierter Mikroorganismen zu einer Steigerung der Produktivität, einer erhöhten Prozessstabilität und zu einer Vereinfachung der Prozessführung führt.

Im Besonderen wurden Möglichkeiten zur Verbesserung der Überlebensrate bei der Immobilisierung in LentiKats<sup>®</sup> untersucht.

Versuche mit neuen 1,3-Propandiolbildnern und die Optimierung grundlegender Parameter wie der Substrat- und Nährstoffversorgung, des pH-Wertes und der Temperatur für diese bisher nicht untersuchten Stämme wurden in Schüttelkolben- und Fermentationsexperimenten durchgeführt, um eine Steigerung der Produktivität und der Produktendkonzentration zu erreichen.

Experimente unter Verwendung verschiedener kostengünstiger Rohglycerinwässer für die Biokonversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol sollten Aufschluß über die Nutzbarkeit billiger Rohglycerinwässer zur Kostensenkung des Produktionsprozesses liefern.

Das zweite grundlegende Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und der Bau eines automatischen Fermentersystems mit angeschlossener online-Analytik, um die Durchführung der Fermentationsexperimente zu vereinfachen.

## **3 Grundlagen – Theoretischer Hintergrund**

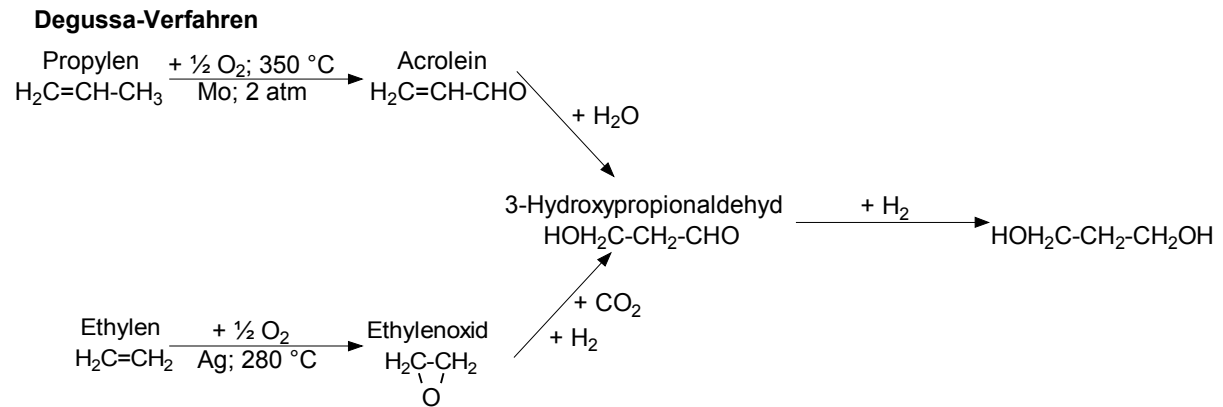
### **3.1 1,3-Propandiol**

Die Herstellung von 1,3-Propandiol, auch als Trimethylenglykol (TMG), 3G oder PDO bekannt, gewinnt zunehmend an Aktualität. Durch optimierte und günstigere Herstellungsverfahren wird der Übergang von der Fein- zur Bulkchemikalie angestrebt. Shell Chemicals erwartet einen Anstieg des Produktionsvolumens bis zum Jahr 2010 auf über 1 Mio. Tonnen pro Jahr. Während die Shell AG sich dabei auf den chemisch-synthetischem Weg durch die Nutzung fossiler Rohstoffe beschränkt, arbeitet die Firma DuPont auch auf dem biotechnologischen Weg der 1,3-Propandiolproduktion unter Verwendung nachwachsender Rohstoffe. Die chemische Synthese von 1,3-Propandiol ist aufwendig und teuer, so dass die gärungstechnische Herstellung aus Glycerin oder anderen Substraten, wie Glucose und Stärke, durch genetisch veränderte Mikroorganismen interessant wird (RÖMPP 1999). Das große Interesse der Industrie an neuen 1,3-Propandiolproduktionswegen und Anwendungen ist aus der Patentsituation auf diesem Gebiet ersichtlich. Seit 1996 sind sieben neue Patente angemeldet worden (DUPONT & GENENCOR 1998, GENENCOR 1998, DUPONT & GENENCOR 1998, HAYNIE UND WAGNER 1996, LAFFEND et al. 1996, NAGARAJAN UND NAKAMURA 1995, WITT ET AL. 1996).

#### **3.1.1 Herstellung von 1,3-Propandiol**

##### **3.1.1.1 Chemische Verfahren**

Es gibt zwei chemische Verfahren (Abbildung 3-1) zur Produktion von 1,3-Propandiol ausgehend von Ethylenoxid (Shell AG) oder Acrolein (Degussa / DuPont). Problematisch bei der chemischen Synthese sind vor allem die Toxizität der Ausgangsverbindungen und Verunreinigungen des entstehenden 1,3-Propandiols (ELM et al. 1980).



**Shell-Verfahren**

**Abbildung 3-1:** Petrochemische Verfahren zur Produktion von 1,3-Propandiol

Das Acrolein-Verfahren ist durch eine notwendige Zwischenextraktion und die destillative Aufreinigung aufwändig. Eine Anlage für die Herstellung von 1,3-Propandiol aus Acrolein in Wesseling bei Köln mit einer Kapazität von etwa 10.000 t/a wurde 1997 von Degussa an DuPont verkauft. DuPont wird mit dieser Anlage sowie einer Anlage nach gleichem Verfahren und einer Kapazität von 50.000 t/a seinen Bedarf an 1,3-Propandiol decken, bis der in Zusammenarbeit mit Genencor entwickelte biotechnische Prozess konkurrenzfähig und aufgebaut ist.

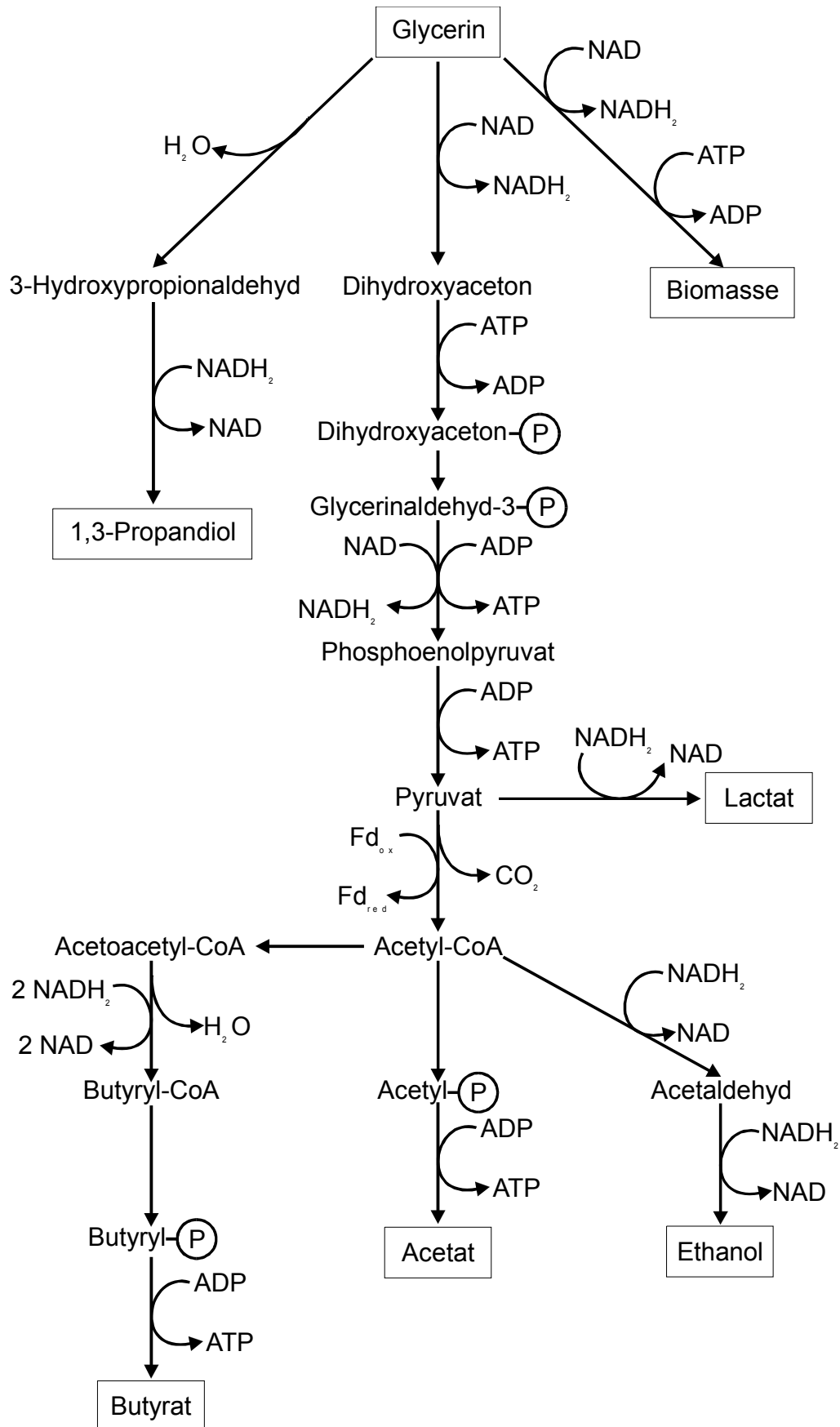
Das Ethylenoxid-Verfahren ist seit 1998 mit einer 70.000 t/a Anlagen der Shell AG in Geismar (USA) realisiert, nachdem es gelungen war, einen Prozess mit günstigen Ausbeuten und niedrigen Kosten auf der Basis von Ethylen zu entwickeln.

### 3.1.1.2 Biotechnologische Verfahren

Dass Mikroorganismen 1,3-Propandiol bilden, ist mehr als 100 Jahre bekannt (FREUND 1881), aber da es lange Zeit keinen Bedarf an 1,3-Propandiol gab, wurden keine weiterführenden Untersuchungen unternommen.

Die Fähigkeit 1,3-Propandiol zu bilden, ist für viele Gattungen, wie *Klebsiella* (NEIJSSSEL et al. 1975, SLININGER et al. 1983), *Citrobacter* (WERKMAN und GILLEN 1932, MICKELSON und WERKMAN 1940, HOMANN et al. 1990, BOENIGK et al. 1993),





**Abbildung 3-2:** Glycerinstoffwechsel von *Clostridium butyricum* nach ZENG 1996.

*Lactobacillus* (CANTONI und MOLNAR 1967, SCHÜTZ und RADLER 1984), *Enterobacter* (BARBIRATO et al. 1995 und 1996) und *Clostridium* (FORSBERG 1987, HEYNDRIX et al. 1991, BIEBL et al. 1992) beschrieben.

Die anaerobe Bildung von 1,3-Propandiol aus Glycerin dient den Mikroorganismen zur Re-Oxidation von Reduktionsäquivalenten (Abbildung 3-2), die bei der Einschleusung von Glycerin in den Intermediärstoffwechsel anfallen. Die Bildung des 1,3-Propandiols steht dabei in Konkurrenz zur Bildung einiger Glycolysemetabolite (Ethanol und Lactat bei *K. pneumoniae*, Butyrat und Ethanol bei *C. butyricum*). Die Produktselektivität und -ausbeute werden durch das Verhältnis dieser Regenerierungswege untereinander bestimmt. Zeng (1996) ermittelte bei der Analyse der Stoffwechselwege von *C. butyricum* eine maximale molare Ausbeute von 72 %, die unter Substratüberschuss erreicht werden kann, wenn zur Energiegewinnung nur Acetat gebildet wird.

Für die technische Produktion eignen sich jedoch nur wenige Organismen, neben *Clostridium* vor allem *Citrobacter* und *Klebsiella* (FORSBERG 1987, HOMANN et al. 1990, GÜNZEL 1991, BIEBL et al. 1992, Barbirato et al. 1995, REIMANN et al. 1996 MENZEL et al. 1997, WITTLICH et al. 2000). Mikroorganismen der beiden letztgenannten Gattungen gehören zu den Enterobacteriaceen. Diese sind im Gegensatz zu Clostridien fakultativ anaerob und somit nicht sauerstoffempfindlich, jedoch sind sie der mikrobiologischen Risikoklasse L2 zugeordnet. Dagegen gehört der 1,3-Propandiol bildende Stamm *C. butyricum* zur niedrigsten mikrobiologischen Risikoklasse L1 (BG Chemie 1998).

Eine Übersicht über die unterschiedlichen Resultate der Forschungsarbeiten über die Biokonversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol ist in Tabelle 3-1 dargestellt. Unterschieden werden muss hier zwischen Verfahren mit freien Zellen, die hohe 1,3-Propandiolendkonzentrationen erreichen, und Verfahren mit immobilisierten Mikroorganismen, welche hohe Produktivitäten erzielen. Das von LUTZ (1999) und WITTLICH (2001) angewandte Verfahren der Immobilisierung in LentiKats® zeichnete sich durch eine hohe Produktivität und eine ausgezeichnete Langzeitstabilität aus. Eine nachgewiesene Infektionsstabilität spricht ebenfalls für dieses Verfahren.

Eine Mischform ist das von REIMANN (1998) verwendete Verfahren mit Zellrückhaltung. Da die Standzeit der Membranen jedoch nur wenige Tage beträgt, ist das Verfahren für den großtechnischen Einsatz ungeeignet.

Neben der Biokonversion von Glycerin wird auch die Umwandlung von Zucker untersucht. Hier liegt vor allem der Forschungsschwerpunkt von DuPont und Genencore (1998), die einen gentechnisch veränderten Stamm von *Escherichia coli* entwickelt haben, der mit 34%iger Ausbeute (kg 1,3-Propandiol / kg Glucose) 1,3-Propandiolkonzentrationen von bis zu  $129 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  erreicht.

Zusätzlich zur Umwandlung der reinen Substrate Glycerin oder Glucose gibt es auch einige Untersuchungen zur Verwendung von Glucose als Co-Substrat.

Verschiedene *Lactobacillus* Stämme sind nur in Gegenwart von Glucose zur 1,3-Propandiolbildung aus Glycerin fähig (SCHÜTZ und RADLER 1984, LÜTHI-PENG et al. 2002), und bei *C. butyricum* DSM 5431 konnte eine erhebliche Steigerung der Ausbeute erreicht werden, wenn ein Medium mit Glycerin und Glucose verwendet wurde (ABBAD-ANDALOUSSI et al. 1998, BIEBL und MARTEN 1995).

Ein weiterer im Mittelpunkt des Interesses stehender Ansatz ist ein zweistufiger Prozess (CAMERON et al. 1998). In der ersten Stufe wird Glucose zu Glycerin umgesetzt, in der zweiten Stufe das Glycerin zu 1,3-Propandiol. Dabei werden bisher Ausbeuten von bis zu 29 % (kg 1,3-Propandiol / kg Glucose) erzielt.

Bei der Herstellung von 1,3-Propandiol konkurrieren also chemisch-synthetische und biotechnische Verfahren miteinander. Von entscheidender Bedeutung sind die Herstellungskosten. Berechnungen (WITTLICH 2001) haben ergeben, dass die Rohstoffkosten von entscheidender Bedeutung sind. Die Biokonversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol wäre bei Rohstoffpreisen von unter 200 €/t konkurrenzfähig. Der Preis für 80 %iges Rohglycerin (siehe Abbildung 3-4) bewegte sich seit 1998 in der Spanne von etwa 330 bis 900 €/t und liegt seit 2001 mit fallender Tendenz bei ungefähr 500 €/t. Da dies für eine wirtschaftliche 1,3-Propandiolproduktion noch immer zu hohe Rohstoffkosten sind, wird im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob Rohglycerinwässer aus unterschiedlichen Produktionsanlagen direkt zur Biokonversion einsetzbar sind. Bei allen Prozessen, bei denen Glycerin anfällt, liegt die Konzentration des Glycerins bei unter 80 %. Deshalb ist bei allen Produktionsanlagen eine Aufarbeitungsstufe nachgeschaltet, in welcher unter anderem eine energieintensive Konzentration des Glycerins auf 80 % stattfindet. Der Verzicht auf diese Aufarbeitung sollte den Rohstoffpreis deutlich senken

**Tabelle 3-1:** Übersicht über die veröffentlichten Ergebnisse zur 1,3-Propandiolbildung

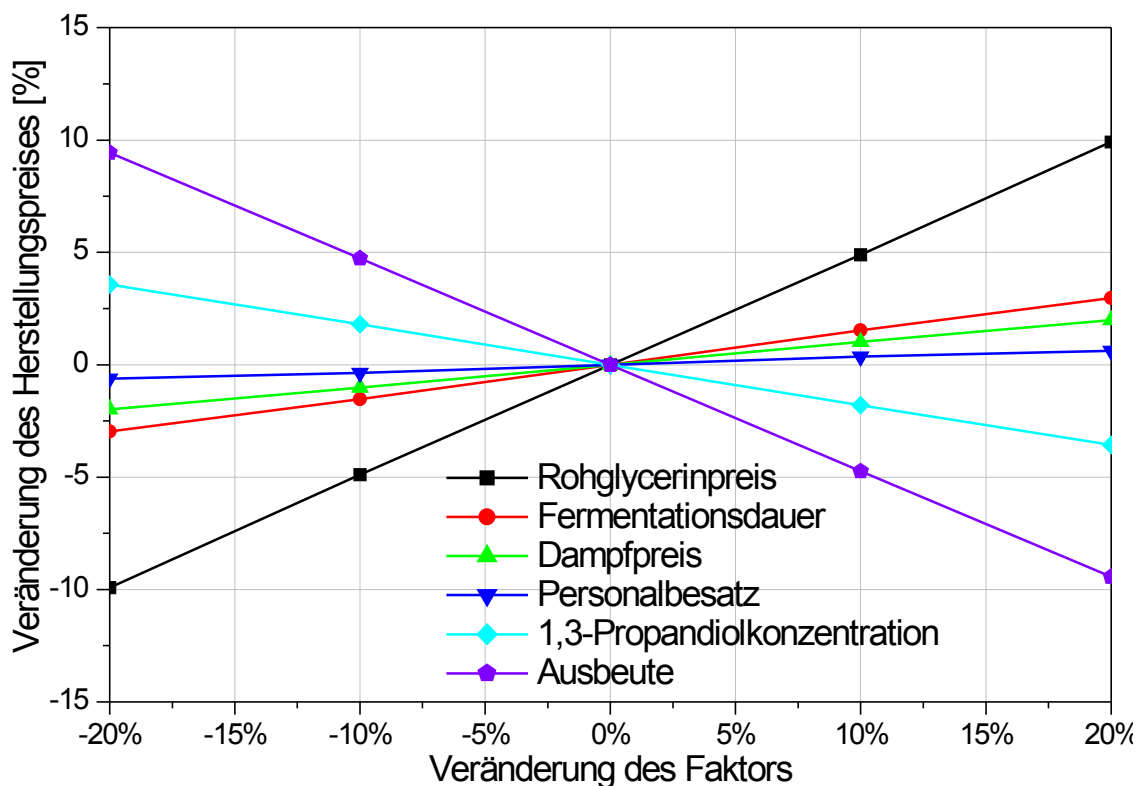
Organismus, Quelle	Typ	S / I	$c_{\text{Glyc}}$ [g·L <sup>-1</sup> ]	$c_{\text{PD}}$ [g·L <sup>-1</sup> ]	$Y'_{\text{PD}}$ [kg·kg <sup>-1</sup> ]	$P_{\text{PD}}^{*)}$ [g·(L·h) <sup>-1</sup> ]
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>						
TAG 1990	batch	S	122	56,2	0,46	2,3
	Konti	S	63	29,9	0,54	8,1
HELD 1996	fed-batch	S	k.A.	72,8	0,40	2,5
LUTZ 1999	batch	I	40	13,5	0,44	26
ZENG 2001	fed-batch	S	k.A.	86	k.A.	k.A.
<b><i>Citrobacter freundii</i></b>						
PFLUGMACHER und GOTTSCHALK 1994	Konti	I	36,8	16,4	0,47	8,2
<b><i>Clostridium butyricum</i></b>						
GÜNZEL <i>et al.</i> 1991	batch	S	50	23,2	0,49	2,2
	fed-batch	S	21	58,0	0,60	2,7
BIEBL <i>et al.</i> 1992	batch	S	110	56,0	k.A.	1,9
	fed-batch	S	84	47,0	k.A.	2,2
SAINT-AMANS <i>et al.</i> 1994	fed-batch	S	65	65	0,47	1,2
PETITDEMANGE <i>et al.</i> 1995	fed-batch	S	50	65,6	0,54	1,4
ABBAD-ANDALOUSSI <i>et al.</i> 1995	fed-batch	S	130	70,6	0,54	0,8
REIMANN A 1997	Konti	S <sup>**) </sup>	56,5	20,9	0,50	21,5 <sup>4*) </sup>
HIMMI <i>et al.</i> 1999	batch	S	121	65,4	0,54	1,7
PAPANIKOLAOU <i>et al.</i> 2000	Konti	S	90	26,1	0,57	5,5
	Konti <sup>3*) </sup>	S	90	41	k.A.	3,4
WITTLICH 2001	fed-batch	I	105	48,5	0,50	2,1
	Konti	I	95,6	14,9	0,43	35,0
<b>gentechnisch veränderter Stamm von <i>Escherichia coli</i></b>						
WO 01/12833A2 Patent 2001	fed-batch	S	12,6 <sup>5*) </sup>	129	0,34 <sup>6*) </sup>	1,7

S: suspendierte, I: immobilisierte Zellen,

<sup>\*)</sup> Die Produktivität von batch bzw. fed-batch Prozessen ist bei jedem Autor unterschiedlich definiert, so dass die Werte nicht direkt vergleichbar sind. <sup>\*\*)</sup>  Membranreaktor mit Zellrückhaltung, <sup>3\*)</sup>  zweistufiger Fermenter, <sup>4\*)</sup>  Standzeit beträgt nur wenige Tage, <sup>5\*)</sup>  Glucosekonzentration, <sup>6\*)</sup>  Ausbeute bezogen auf Glucose

Die Auswirkungen einer Preissenkung für das verwendete Rohglycerin, sowie der Einfluss weiterer Faktoren auf die Herstellungskosten von 1,3-Propandiol durch Biokonversion aus Glycerin ist in Abbildung 3-3 für eine Biokonversionsanlage mit einer Jahresproduktion von 5 kt dargestellt. Die Berechnungen basieren dabei auf einem fed-batch-Prozess.

Man erkennt deutlich, dass der Rohglycerinpreis und die Ausbeute des Biokonversionsprozesses den größten Einfluss auf den Herstellungspreis von 1,3-Propandiol haben, während Änderungen der Personalkosten und des Dampfpreises nur geringe Auswirkungen auf die Produktionskosten haben. Der Einfluss von 1,3-Propandiolendkonzentration und Fermentationsdauer ist von mittlerer Relevanz. Für die Realisierung eines zur chemischen Produktion konkurrenzfähigen Prozesses ist es daher nötig, einen Biokonversionsprozess mit hoher Ausbeute und Produktivität bei hoher 1,3-Propandiolendkonzentration unter Verwendung von möglichst preiswertem Rohglycerin zu entwickeln.



**Abbildung 3-3:** Einflussfaktoren auf den Herstellungspreis von 1,3-Propandiol mittels Biokonversion aus Glycerin einer 5 kt/a Anlage und die Auswirkungen von Änderungen dieser Faktoren (Rohglycerinpreis: 500 EUR/t, 1,3-Propandiolendkonzentration:  $85 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , Ausbeute:  $0,5 \text{ g/g}$ , Fermentationsdauer: 48 h, Dampfpreis: 24 EUR/MWh, Personalbesatz: 8 AK) (BAGANZ 2003)

### 3.1.2 Anwendungen von 1,3-Propandiol

1,3-Propandiol hat ein breites Anwendungsspektrum. Doch stand dem großtechnischen Einsatz der hohe Preis bei der chemischen Herstellung von 1,3-Propandiol nach dem Acrolein-Verfahren entgegen (siehe 3.1.1.1). 1,3-Propandiol wurde daher vorwiegend als Basis für Schmierstoffadditive und in der Lackindustrie eingesetzt. Seit Einführung des Ethylenoxid-Verfahrens und der damit verbundenen Preissenkung hat sich das Spektrum der Anwendungen erweitert. 1,3-Propandiol eignet sich aufgrund seiner chemischen Eigenschaften sehr gut für die Herstellung von Polyestern und Polyurethanen, z.B. für die Produktion von Schaumstoffen, Kunstfasern, Filmen und Beschichtungen. Die Verwendung von 1,3-Propandiol führt dabei zu besseren Produkteigenschaften wie höhere Elastizität, geringere Kristallinität und geringere Karzinogenität (ELM et al. 1980). Da 1,3-Propandiol und, je nach Vernetzungsgrad, auch seine Verbindungen biologisch abbaubar sind, bietet sich 1,3-Propandiol für die Herstellung umweltverträglicher Materialien für Gebrauchsgegenstände, Verpackungen und bioabbaubare und damit umweltfreundlichere Kunststoffe (Potera 1997) an. Polyester-Copolymere aus 1,3-Propandiol und Adipin- oder Terephthalsäure sind nach Untersuchungen von Witt et al. (1994, 1995, 1996) in Abhängigkeit von den Mischungsverhältnissen teilweise sehr gut biologisch abbaubar und zeigen gleichzeitig zufrieden stellende physikalische Eigenschaften, die durch die unterschiedlichen Anteile der Monomere variiert werden können. Den momentan größten Markt für 1,3-Propandiol stellt der Einsatz als Monomer bei der Herstellung von Polytrimethylenterephthalat dar. Dieses ist ein Polymer, welches sich durch hervorragende elastische Eigenschaften ähnlich denen von Nylon und einer Beständigkeit gegenüber Chemikalien ähnlich der von Polyestern auszeichnet. Es ist daher hervorragend für den Einsatz im Teppichboden- und Textilbereich geeignet, wobei es sich auf herkömmlichen Anlagen der kunststoffverarbeitenden Industrie verarbeiten lässt. Für Polytrimethylenterephthalat, welches unter dem Handelsnamen Corterra<sup>®</sup> und Sonora<sup>®</sup> auf dem Markt ist, wird ein Bedarf von über 1Mio. t/a im Jahre 2010 prognostiziert (PFEFFER 1999).

## 3.2 Glycerin

Glycerin - 1,2,3-Propantriol ( $C_3H_8O_3$ ) - eine farblose, ölige Flüssigkeit, hat eine Dichte von  $1262 \text{ kg/m}^3$  und einen Siedepunkt von  $290^\circ\text{C}$ . Glycerin, welches beliebig mit Alkohol und Wasser mischbar ist, wird als "Rohglycerin" mit etwa 80% Glycerin-Gehalt sowie in aufbereiteter (refined) Form mit Reinheiten um 99,5% (Pharmaglycerin) gehandelt. Glycerin fällt in der Industrie sowohl als Hauptprodukt einer Fertigung als auch als Nebenprodukt an. Für die Herstellung von "synthetischem" Glycerin sind mehrere technische Verfahren eingeführt, die, wie z.B. die Produktion aus Propen, über mehrere Zwischenstufen zum Hauptprodukt Glycerin führen.

Zu einer biotechnischen Erzeugung von Glycerin z.B. aus kohlehydrathaltigen Pflanzen liegen zahlreiche Veröffentlichungen vor (u.a. GONZALEZ 1994, PATIL 1996, MYERS 1997).

### 3.2.1 Anwendungen von Glycerin

Glycerin wird als chemischer Grundstoff u.a. für die Herstellung von Kunststoffen (Alkydharzen, Polyurethanen,..) und in der Tabak- (Tabakbefeuchtung), Lebensmittel- (z.B. Getränkeherstellung) und Kosmetikindustrie (Cremes, Zahnpasten, etc.) eingesetzt. In geringerem Umfang findet es z.B. als Lösungsmittel, Weichmacher und als Nitroglycerin (4%) Verwendung (FALBE 1995). Eine Übersicht über die Bedeutung der einzelnen Anwendungsgebiete für den Glycerinmarkt in Europa ist für 1993 und 1997 in Tabelle 3-2 gegeben.

Da die Menge an produziertem Glycerin kontinuierlich ansteigt (Tabelle 3-3), der Verbrauch aber nicht in gleichem Maße wächst, fällt der Glycerinpreis. Dies führt zu einer verstärkten Forschung nach neuen Anwendungsgebieten für Glycerin, unter anderem auch zu einem verstärkten Interesse an der Biokonversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol.

**Tabelle 3-2:** Glycerinverbrauch in West Europa 1993 und 1997 (nach HEMING 1999)

	1993 Verbrauch [%]	1997 Verbrauch [%]
Pharmazeutika	9,4	9,8
Kosmetika/Seifen	14,5	16,1
Ester	13,1	10,7
Polyole	10,6	11,7
Alkydharze	7,1	5,7
Nahrungsmittel	7,0	8,5
Zellulose Filme	5,8	3,1
sonst. chem. Anwendungen	3,5	8,2
Tabakindustrie	3,3	3,6
Sprengstoffe	0,7	0,2
Papierindustrie	1,1	0,9
Wiederverkauf	18,5	17,3
sonstige	5,4	4,2
total	100,0	100,0

### 3.2.2 Gewinnung von Glycerin

Glycerin fällt als Nebenprodukt bei der Verseifung von Fetten, bei der Spaltung von Ölen und Fetten zu Fettsäuren und bei der Veresterung oder Umesterung von Ölen und Fetten an. Mehr als 85 % des Glycerins stammen aus diesen Prozessen der fettverarbeitenden Industrie (siehe Tabelle 3-3). Neben dem starken Wachstum der fett- und ölverarbeitenden Industrie in Südostasien werden auch in Europa zusätzlich Ölsaaten als *Non-food*-Materialien oder nachwachsende Rohstoffe auf Stilllegungsflächen angebaut. Es wird prognostiziert, dass die Produktion von Pflanzenölen von weltweit 70,6 Mio t/a (1993 – 1997) auf 108 Mio t/a (2008 – 2012) steigen wird (MURPHY 1996). Deshalb ist die Gesamtmenge an Glycerin in den letzten Jahren deutlich gestiegen. Rückgänge bei der Seifenproduktion wurden durch die Herstellung von Fettalkoholen und –säuren mehr als kompensiert. Der Beitrag der Biodieselherstellung wird zunehmend wichtiger, da, vor dem Hintergrund steigender



Rohölpreise (TECSON 2000) und der wirtschaftlichen Förderung die Produktionskapazitäten ausgebaut werden.

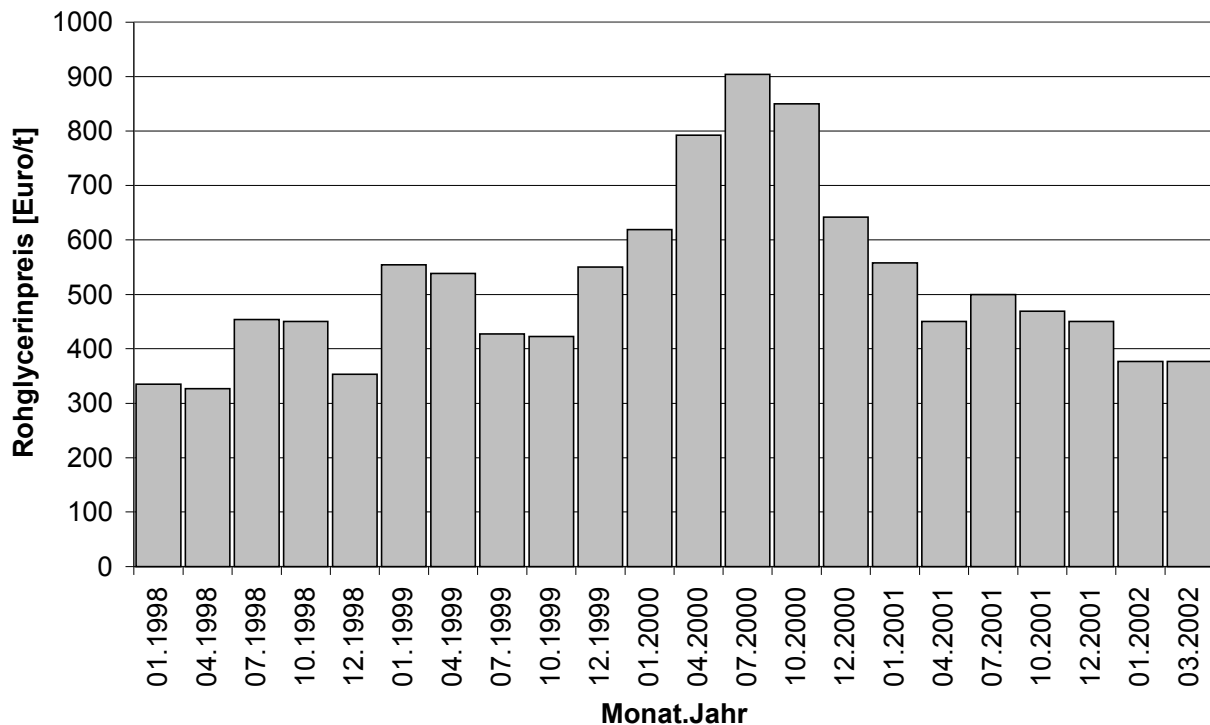
**Tabelle 3-3:** Glycerinherkunft und –mengen in den Jahren 1992, 1995 und 1998

Herkunft des Glycerins	Glycerinaufkommen, weltweit [t]			
	Jahr	1992	1995	1998*)
1. Seifenherstellung		208.000	210.000	199.000
2. Fettsäuregewinnung		268.000	286.000	304.000
3. Fettalkoholgewinnung, Umesterung				
a. Fettalkoholgewinnung		78.000	99.000	109.000
b. Biodieselherstellung		6.000	40.000	55.000
c. Produktion von Fettersatzstoffen		-	-	3.000
d. sonstige		-	15.000	20.000
4. Synthese		78.000	80.000	95.000
5. Fermentative Herstellung		-	-	15.000
<b>Summe:</b>		<b>638.000</b>	<b>730.000</b>	<b>800.000</b>

\*) geschätzte Werte (HEMING 1999)

Neue Produkte wie etwa Fettersatzstoffe (z.B. Olean® von Procter&Gamble) gewinnen an Bedeutung. HEMING BOUKRIS INTERNATIONAL prognostiziert eine Glycerinmenge in der Höhe von 60.000 t durch die Olestra-Produktion im Jahr 2000. Das entspricht einem Drittel des US-amerikanischen Glycerin-Marktes im Jahre 1997 (HBI 1997). Mit der steigenden Glycerinmenge am Markt geht ein Preisverfall für Glycerin einher. Von 1993 bis 2000 fiel der Preis für Glycerin in Pharmaqualität von um die 3100 DM/t (HBI 1997) auf unter 1600 DM/t (LANGBEHN L 2000).

Seit 1998 bewegte sich der Preis für 80 %iges Rohglycerin frei Rotterdam in der Spanne von etwa 330 bis 900 EUR/t (HBI 1999, COGNIS 2002). Die aktuellen Werte seit 2001 liegen um 500 EUR/t mit fallender Tendenz.



**Abbildung 3-4:** Großhandelspreise für 80%iges Rohglycerin frei Rotterdam (nach COGNIS 2002)

Glycerin wird in zwei Qualitäten gehandelt, als Pharmaglycerin mit einer Reinheit von 99,5 % und als Rohglycerin mit ca. 80 % Glyceringehalt. Das Glycerin fällt bei der Herstellung aber nicht in diesen Konzentrationen an, sondern wird erst in Aufarbeitungsschritten auf diese Konzentrationen angereichert. Da dieses Konzentrieren energieintensiv und damit kostenintensiv ist, würde der Einsatz von niedrig konzentrierten Rohglycerinwässern zur Biokonversion zu einer deutlichen Kostenminderung führen.

Das Eindampfen des Glycerinwassers ist ein energie- und damit kostenaufwändiger Prozess. Für die Erzeugung von einer Tonne Rohglycerin (80%) müssen beispielsweise aus einer 10%-igen Unterlauge über 7 t Wasser verdampft werden. Bei den aktuellen Energiepreisen liegen damit die Energiekosten bei etwa 20 Euro/t verdampften Wassers. Dies führt dazu, dass z.B. die Glycerinwasser-Aufbereitung aus der Verseifung nur bei günstigen Marktpreisen und weiteren Randbedingungen wirtschaftlich ist.

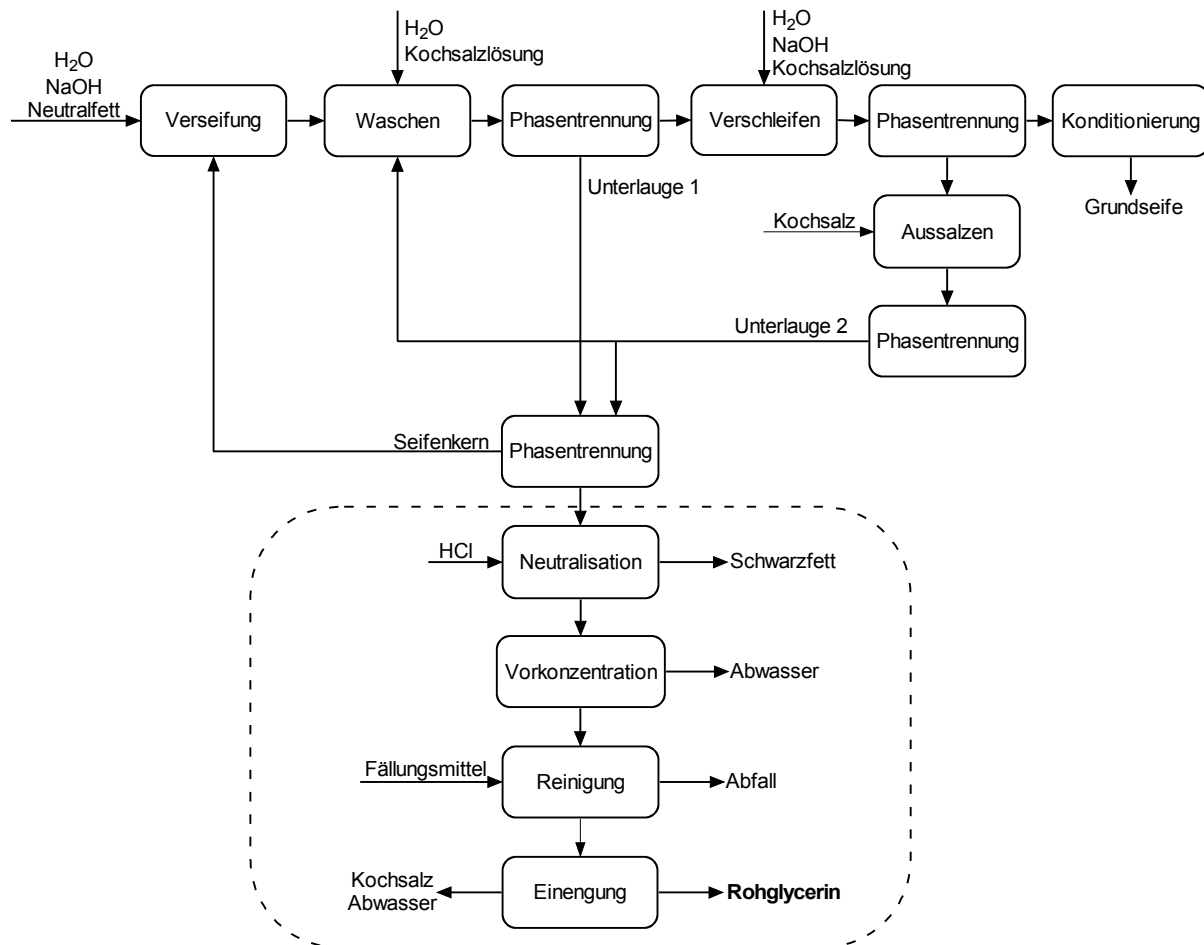
Aus dieser Grobabschätzung kann gefolgert werden, dass die Bereitstellung einer Mengeneinheit Glycerin für die Biokonversion am kostengünstigsten durch Glycerinwasser geringer Konzentration erfolgt. Fed-batch-Prozesse sind dabei gegenüber Batch-Prozessen benachteiligt, da der Anteil des Glycerins im Feed in konzentrierter und damit deutlich teurerer Form benötigt wird. Aus wirtschaftlicher Sicht sind daher Prozesse mit weitgehender Beschränkung auf Glycerinwässer im Konzentrationsbereich 10 - 20 % besonders interessant.

Im Folgenden soll deshalb ein Überblick über die in Deutschland relevanten Glycerinproduzierenden Prozesse und die dabei anfallenden Rohglycerinwässer gegeben werden.

#### **3.2.2.1 Verseifung**

Bei der Verseifung werden die zur Verwendung kommenden Öle/Fette mit Natronlauge erwärmt. Dabei kommt es zum Austausch von Glycerin und Natriumionen und es entstehen die Natriumsalze der Fettsäuren (Seifen) und freies Glycerin.

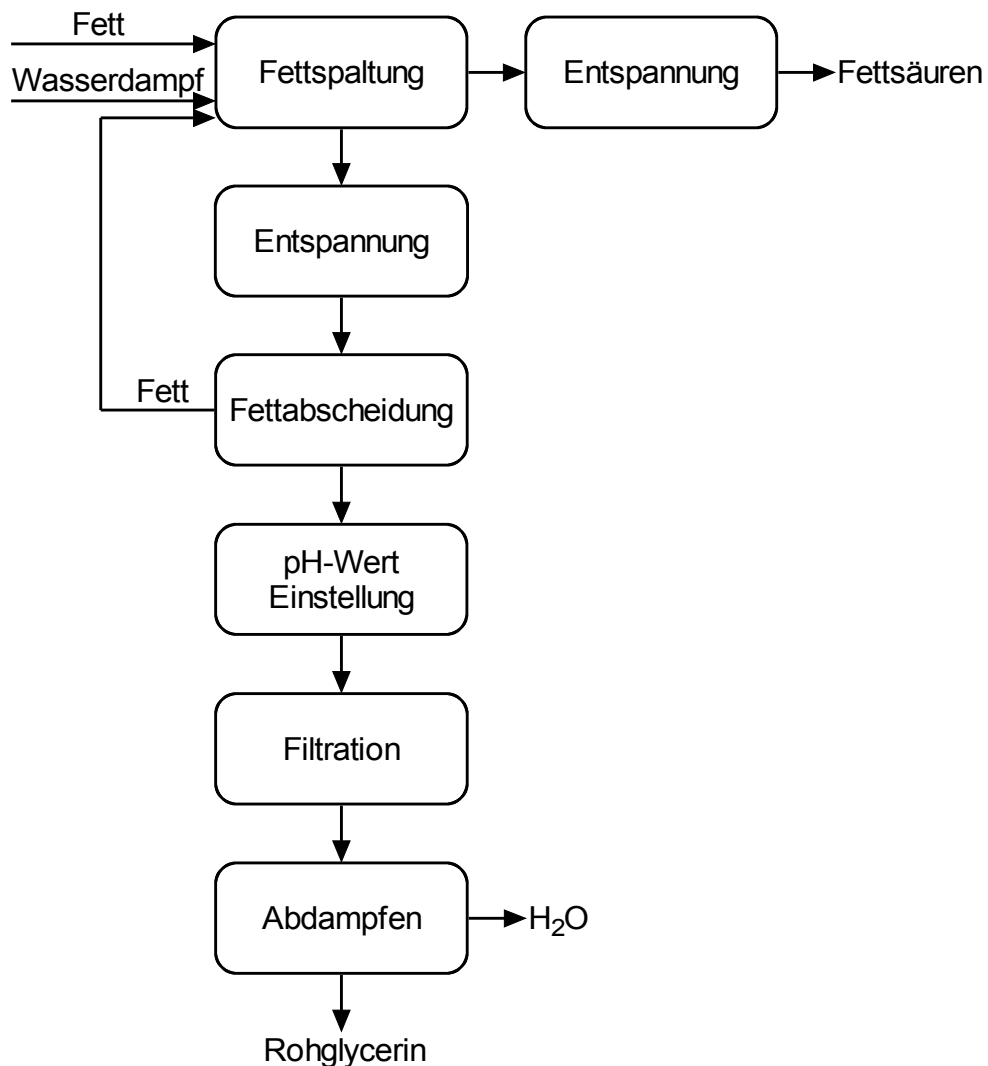
Der schematische Verfahrensablauf bei der Seifenherstellung ist in Abbildung 3-5 dargestellt.



**Abbildung 3-5:** Schematische Darstellung einer typischen Anlage zur Seifenherstellung

Der grundlegenden Reaktion, in diesem Fall der Verseifung, folgt eine Phasentrennung. Die glycerinhaltige Phase wird hier als Unterlage bezeichnet. Die Unterlaugenaufbereitung (durch die gestrichelte Umrahmung gekennzeichnet) liefert das Rohglycerin. Die Glycerinkonzentration in der Unterlage der Verseifungsanlagen liegt typischerweise im Bereich von 10 – 12 %.

### 3.2.2.2 Fettspaltung



**Abbildung 3-6:** Verfahrensschema einer Fettspaltungsanlage

Bei der Fettspaltung werden die verwendeten Öle/Fette unter Zugabe von Wasserdampf bei erhöhter Temperatur und erhöhtem Druck in freie Fettsäuren und Glycerin gespalten. Die Phasentrennung erfolgt bereits unmittelbar nach der Reaktion (siehe Abbildung 3-6). Da die Anlagen zur Fettspaltung ohne weitere Prozesschemikalien betrieben werden, sind die Rohglycerinwässer aus der Fettspaltung am unkritischsten. Die Glycerinkonzentration liegt vor Aufarbeitung typischerweise im Bereich von 15 – 20 %.

### 3.2.2.3 Umesterung

Die Umesterung von Fetten und Ölen lässt sich nicht mehr so einfach betrachten wie die Prozesse zur Verseifung oder Fettspaltung, da eine Vielzahl von Verfahren am Markt etabliert sind. Die Bandbreite der Unterschiede soll hier am Beispiel dreier Prozesse zur Biodieselherstellung gezeigt werden. Der Sektor der Biodieselproduktion, der 1998 bereits etwa 7% der Weltproduktion an Glycerin lieferte, befindet sich durch die Entwicklung der Rohölpreise und politische Förderung in einer Expansionsphase.

Bei der Umesterung von Pflanzenölen zur Herstellung von Rapsölmethylester werden Rapsöl und Methanol in Gegenwart eines alkalischen Katalysators (z.B. Natron- oder Kalilauge) erwärmt. Dabei wird das Glycerin durch Methanol ausgetauscht und es entstehen Fettsäure-Methylester und Glycerin.

Die Umesterungsanlagen zur Herstellung von Rapsölmethylester als Biodiesel können in Deutschland größtenteils den drei verfahrenstechnischen Grundtypen: Feld+Hahn (FELD+HAHN 1994), Vogel & Noot (VOGEL & NOOT 1992) und dem CD-Prozess (CONNEMANN 1992) ("CD" leitet sich von "continuous deglycerinization" ab) zugeordnet werden.

Die verfahrenstechnische Umsetzung zeigt bei den dargelegten Grundtypen gleiche Grundsätze. Die Edukte Pflanzenöl und Methanol werden vor oder in der ersten Umesterungsstufe mit dem Katalysator vermischt. Die Umesterung findet drucklos bei Temperaturen von Raumtemperatur bis 100°C statt. Im folgenden Verfahrensschritt werden die entstandenen Phasen getrennt. Die Rapsölmethylester-Phase wird nach der letzten Umesterungsstufe und Phasentrennung entsprechend dem Qualitätsstandard nach DIN Norm V 51606 aufbereitet. Hierbei abgedampftes Überschussmethanol wird in der Regel aufbereitet und einer Umesterungsstufe zugeführt. Die wichtigsten Prozessdaten dieser Verfahren sind in Tabelle 3-4 dargestellt.

**Tabelle 3-4:** Übersicht über einige Prozessdaten der Umesterungsprozesse

Verfahren	Feld+Hahn	Vogel & Noot	CD-Prozess
Betriebsweise	batch	batch	kontinuierlich
Edukt- anforderungen	entschleimt, gebleicht, entsäuert	roh, entschleimt	roh
Rapsöl			
eingesetzte Menge	3,6	4,2	2,4-2,6 Stufe 1
Methanol mol/mol Öl			1,2-1,4 ab Stufe 2
Katalysator	NaOH	KOH	NaOH
Katalysatormenge in % des Öles	0,4%	1,4%	0,24-0,36 Gew. % von Methanol
Reaktionstemperatur	70°C	Raumtemperatur	60°C bis 100°C
Reaktionsdruck	drucklos	drucklos	drucklos
Hilfsstoffe in der Glycerinaufbereitung	CaOH, NaOH, HCl,	KOH, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	wässrige Extraktionsmittel Filterhilfsmittel

Die Verfahren Feld+Hahn (Abbildung 3-7) und Vogel & Noot (Abbildung 3-8) haben bei der Umesterung und Phasentrennung ähnliche Prozessführungen mit den hauptsächlichen Unterschieden in Reaktionstemperatur und Katalysatoren. Beim Verfahren Vogel & Noot wird Wasser oder eine Säure nach der Umesterung zugegeben. Die Phasentrennung nach der Umesterung erfolgt bei beiden Verfahren statisch durch eine angemessene Verweilzeit im Reaktor oder durch einen nachgeschalteten Absetzer. Unterschiede bei der Glycerinaufarbeitung ergeben sich in der Anzahl und Reihenfolge der Verfahrensschritte, Art und Weise der Kreislaufführungen, auch im Anschluss an den Gesamtprozess sowie bei den eingesetzten Hilfsstoffen. Der CD-Prozess (Abbildung 3-9) zeichnet sich durch eine kontinuierliche Prozessführung mit mindestens zwei Umesterungsstufen aus. Vor dem Eintritt in die nächste Umesterungsstufe wird permanent das Glycerin aus dem Reaktionsgemisch abgetrennt.

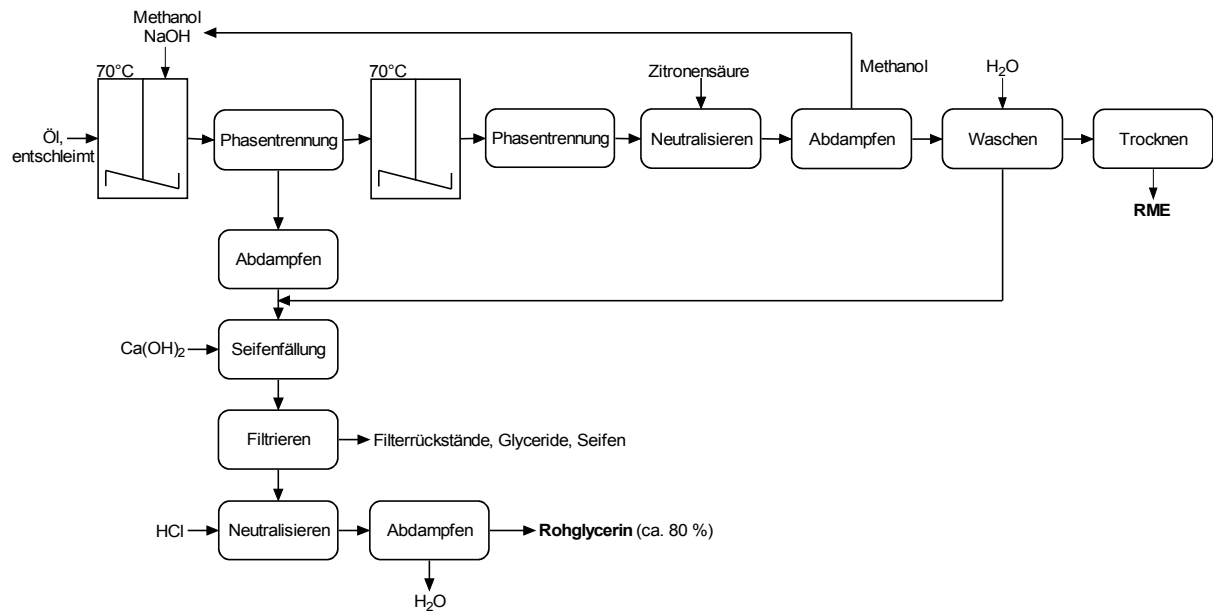


Abbildung 3-7: Schema einer Anlage nach Feld+Hahn

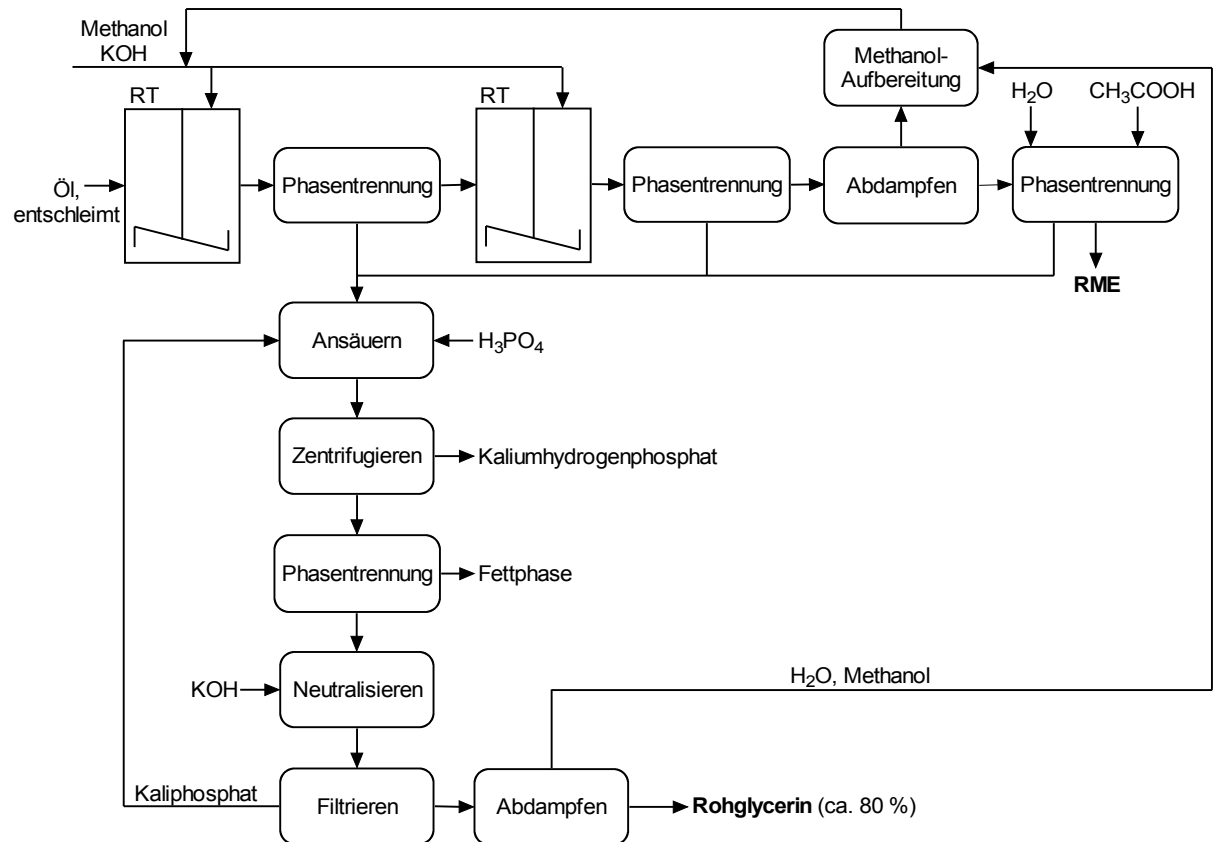
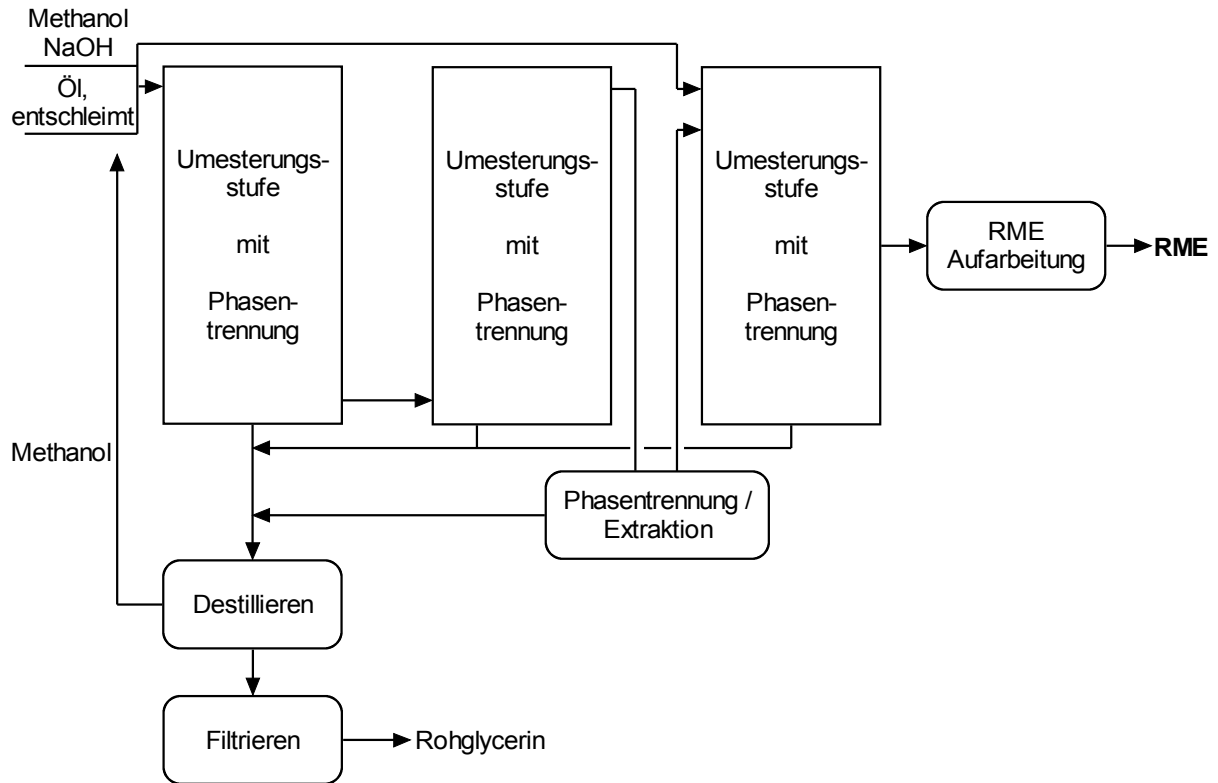


Abbildung 3-8: Schema einer Anlage nach Vogel &amp; Noot





**Abbildung 3-9:** Schema einer dreistufigen Anlage nach dem CD-Prozess

Aufgrund der großen Bandbreite an Anlagentypen zur Herstellung von Rapsölmethylestern ergibt sich auch für die Rohglycerinwässer aus diesen Anlagen eine breite Streuung des Glyceringehaltes. Der Glyceringehalt liegt in Abhängigkeit vom Anlagentyp zwischen 35 und 65 %.



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Verwendete Kulturmedien, Lösungen und Chemikalien

Im Folgenden ist die Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien wiedergegeben. Dabei wird an dieser Stelle nicht auf alle Varianten und Ergänzungen der einzelnen Medien eingegangen. Falls den Medien zusätzliche Bestandteile oder Bestandteile in abgewandelter Form zugesetzt wurden, wird darauf im Einzelfall hingewiesen.

Es wurden i.d.R. Chemikalien in pro analysi Qualität von Merck (Darmstadt) oder Fluka (Buchs, CH) eingesetzt. Als C-Quelle wurden vorwiegend das Roh- und Reinglycerin aus der Fettspaltung der Prignitzer Chemie GmbH in Wittenberge eingesetzt. Als komplexer Medienbestandteil wurde technischer Hefeextrakt von Ohly (Hamburg) benutzt.

#### 4.1.1 Mineralsalzmedium

Für sämtliche Versuche wurde ein halb definiertes Medium verwendet, das je nach Versuch als Variation von vier Standardmedien verwendet wurde. Die Zusammensetzung dieser Medien ist in Tabelle 4-1 aufgeführt.

Das Mineralsalzmedium wird in dieser Arbeit häufig mit einer Kurzschreibweise angegeben. So bezeichnet etwa  $\text{MinS}^{66}\text{N}^{10}\text{PG}^{50}$  ein mit 66 mM ( $9,09 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) Phosphat gepuffertes Mineralsalzmedium (MinS) mit einem Stickstoffgehalt (N) von 10 mM ( $0,535 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) und einem Glycingehalt von  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  bei verwendetem Pharmaglycerin (PG). Die Verwendung von Rohglycerin wird durch das Kürzel RG gekennzeichnet.

**Tabelle 4-1:** Standardvarianten der verwendeten Kulturmedien

	Schüttelkolben freie Zellen MinS <sup>66</sup> N <sup>10</sup>	Schüttelkolben Immobilisate MinS <sup>66</sup> N <sup>100</sup>	Fermentation MinS <sup>10</sup> N <sup>33</sup>	Fermentation MinS <sup>15</sup> N <sup>50</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9,09 g	9,09 g	1,38 g	2,75 g
NH <sub>4</sub> Cl	0,535 g	5,35 g	1,75 g	2,68 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,123 g	0,123 g	0,123 g	0,186 g
CaSO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,017 g	0,017 g	0,017 g	0,025 g
FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,010 g	0,010 g	0,010 g	0,015 g
Hefeextrat	1,0 g	1,0 g	5,0 g	5,0 g
Resazurin, 0,1 %	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
L-Cystein · HCl	0,1 g	0,1 g	0,1 g	0,1 g
Spurenelementelösung DSMZ 144	10 ml	10 ml	10 ml	15 ml
Glycerin	variabel	variabel	variabel	variabel
	ad 1 L deion. H <sub>2</sub> O			
pH-Wert	7,5		variabel	

#### 4.1.2 Spurenelementelösung zu DSMZ-Medium 144

Die Spurenelementelösung wurde nach den in Tabelle 4-2 angegebenen Konzentrationen 5-fach konzentriert angesetzt, um die Einwaagegenauigkeit zu erhöhen und anschließend zur Medienbereitung in entsprechend geringerer Menge verwendet.

**Tabelle 4-2:** Zusammensetzung der Spurenelementelösung zum DSMZ-Medium 144

Nitrilotriessigsäure	12,8 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,17 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{ZnCl}_2$	0,1 g
$\text{CuCl}_2$	0,02 g
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,01 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,01 g
$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,026 g
$\text{NaCl}$	1,0 g
$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,02 g
<hr/>	
	ad 1 L deion. $\text{H}_2\text{O}$

#### 4.1.3 Bereitung anaerober Medien

Das Medium wurde nach der jeweils gegebenen Zusammensetzung ohne Zugabe von L-Cystein-hydrochlorid in Flaschen vorbereitet und in einem Mikrowellengerät (Moulinex, Solingen) auf etwa 70 bis 80 °C erhitzt. Anschließend wurde das L-Cystein zugegeben und die Flasche leicht geöffnet in den vorgeheizten Tischautoklaven (Wolf SANOclav, Geislingen) gestellt. Nach Erreichen einer Temperatur von 100 °C im Innenraum des Autoklaven ließ man für etwa 5 Minuten Wasserdampf und Sauerstoff entweichen und verschloss dann das Auslassventil. Nach Erhitzen auf 121 °C, einer Haltezeit von etwa 30 Minuten sowie Abkühlen auf 100 °C und einem Überdruck von 0 bar wurde der Deckel des Autoklaven rasch geöffnet und die Flasche mit Medium umgehend verschlossen.

Die verschlossene Flasche wurde nach Abkühlen auf Raumtemperatur in die Anaerobierbank (FormaScientific, Marietta, OH, USA) eingeschleust und dort bis zu ihrer Verwendung gelagert oder für Experimente außerhalb der Anaerobierbank in luftdichte Glasvials gefüllt.

## **4.2 Immobilisierung der Mikroorganismen**

### **4.2.1 Immobilisierung in linsenförmige Gele auf Basis von PVA – LentiKats®**

Die Vorbereitung der gebrauchsfertigen Polymerlösung LentiKat®Liquid erfolgte nach Vorschrift (geniaLab 2001). Die Polymerlösung wurde in der Mikrowelle bei geschlossenem Schraubdeckel bis zum Sieden erhitzt. Dabei wurde der entstehende Überdruck mehrfach durch ein kurzes Lockern des Schraubdeckels abgelassen. Nachdem sich der PVA vollständig gelöst hatte, wurde die Polymerlösung auf 30 bis 35 °C abgekühlt und die Zellsuspension zugegeben. Nach kurzem Schütteln wurden die Zellen durch 3minütiges Rühren auf einem Magnetrührer gleichmäßig dispergiert.

### **4.2.2 Herstellung von LentiKats®**

Das Prinzip der Herstellung von LentiKats beruht auf dem Auftropfen des mit Zellsuspension versetzten LentiKat®Liquid auf eine glatte Oberfläche. Durch kontrolliertes Trocknen und anschließendes Rückquellen kommt es zur Gelierung und Ausbildung eines stabilen Hydrogels.

### **4.2.3 Herstellung von LentiKats® mit dem LentiKat®Printer**

Zur reproduzierbaren Produktion kleinerer LentiKat®-Mengen wurde ein LentiKat®Printer verwendet. Das Funktionsprinzip des LentiKat®Printers beruht auf dem Anhaften der Polymerlösung an Stahlstiften, wenn diese kurz in die Polymerlösung getaucht werden. Nach dem Herausnehmen sammelt sich die Polymerlösung am unteren Ende der Stahlstifte und kann durch Aufsetzen auf eine glatte Oberfläche auf diese überführt werden, wo durch Trocknen die linsenförmigen Hydrogele entstehen. Beim LentiKat®Printer geschieht dies unter Verwendung von Polystyrol Petrischalen (Ø 145 mm). Ein Boden wird mit dem zellbeladenen

LentiKat<sup>®</sup>Liquid befüllt, die Stahlstifte mit dem Printer in diese Suspension abgesenkt, angehoben und die anhaftenden Tropfen auf den Deckel der Petrischale abgesetzt.

Die mit Tropfen besetzten Deckel wurden unter einem Ventilator auf 30% Restmasse getrocknet. Der Trocknungsfortschritt wurde dabei mit einer Waage überwacht. Nach 5minütigem Rückquellen mit Stabilizer wurden die Linsen mit einem Gummischaber in einen Kolben mit Stabilizer überführt. Dieser Kolben wurde in die Anaerobierbank eingeschleust und die Linsen sofort zweimal und ein weiteres mal nach 90 Minuten mit Medium gewaschen. Anschließend wurden die Immobilisate inkubiert.

## **4.3 Mikroskopische Untersuchungen**

### **4.3.1 Freie Zellen**

Um die Reinheit der Kulturen, d.h. das Fehlen von kontaminierenden Mikroorganismen, zu überprüfen, wurden Proben aus Bakterienkulturen regelmäßig mikroskopisch untersucht.

### **4.3.2 Immobilisierte Zellen**

Bei der Abschätzung der Überlebensrate während der Immobilisierung und der Beobachtung des Anwachsens der immobilisierten Zellen spielte die mikroskopische Betrachtung unter einer Stereolupe (SV8, Zeiss, Oberkochen) eine zentrale Rolle.

Um den Kontrast zwischen Kolonien und Matrix zu erhöhen, wurden die Zellen für 30 Minuten in 1:100 verdünnter Carbol-Fuchsin-Lösung (Färbelösung nach ZIEHL und NEELSEN, Fluka, Buchs, CH) angefärbt. Durch mehrmaliges Waschen über insgesamt 45 Minuten mit Leitungswasser wurde die Matrix durch Auswaschen des Farbstoffes entfärbt.

#### **4.4 Bestimmung der Zellzahl**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte phasenkontrast-mikroskopisch bei 400facher Vergrößerung mit Hilfe einer Zählkammer nach Thoma.

#### **4.5 Bestimmung der Optischen Dichte**

Die Optische Dichte (OD) wurde mittels photometrischer Messung (PM2 A, Zeiss, Oberkochen) der Transmission bei 605 nm bestimmt, welche über die Formel  $OD_{605} = -\log_{10}(T_{605})$  in die OD umgerechnet wurde.

Die Bestimmung der Transmission ( $T_{605}$ ) erfolgte stets gegen Wasser als Referenz. Bei Transmissionen unterhalb etwa 0,40 wurden die Proben zum Erreichen eines Wertes oberhalb dieser Grenze verdünnt.

#### **4.6 Messung der Biotrockenmasse (BTM)**

Zur Bestimmung der Biotrockenmasse wurden 1,8 ml Reaktionsgefäße (Sarstedt, Nümbrecht) getrocknet und ausgewogen. In diesen Reaktionsgefäßen wurden die Zellen eines definierten Volumens an Medium (1 ml) durch Zentrifugieren (5 Min, 14.000  $\text{min}^{-1}$ , Modell 5417, Eppendorf Gerätebau, Engelsdorf) abgetrennt. Der Überstand wurde verworfen und nach einem Waschschrift mit Leitungswasser wurde das Pellet im Exikator bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Durch Bestimmung der Gewichts Differenz konnte anschließend die Biotrockenmasse berechnet werden.



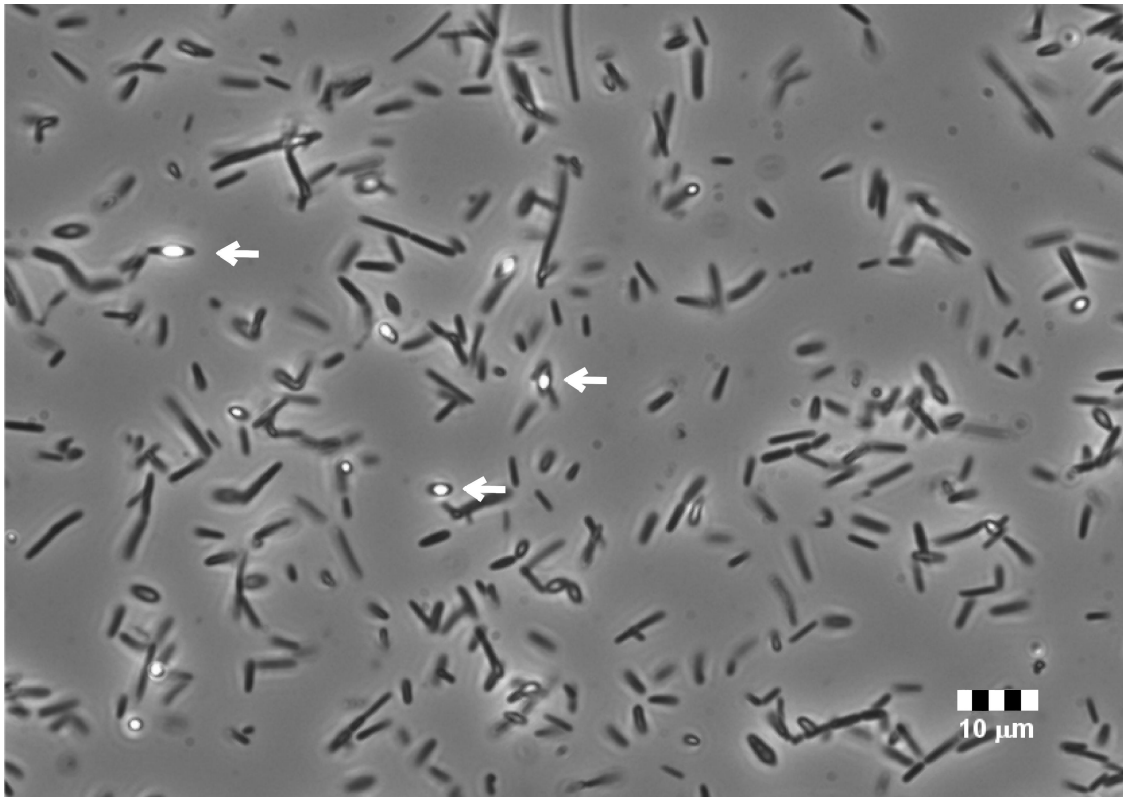
## 4.7 Verwendete Mikroorganismen

### 4.7.1 *Clostridium butyricum* NRRL B-1024

Bei dem für die Experimente verwendeten Bakterienstamm *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 (Abbildung 4-1) handelte es sich um einen schon in vorangegangenen Arbeiten (WITTLICH 2001) verwendeten Stamm. Er wurde von Dr. LAWRENCE NAKAMURA von der *Agricultural Research Service Culture Collection* (Peoria, IL, USA) zur Verfügung gestellt. Der Stamm ist identisch mit *C. butyricum* ATCC 859.

Bei *Clostridium butyricum* handelt es sich um die *type species* der Gattung *Clostridium* (HOLT et al. 1994, Cummins und JOHNSON 1971). Es wurden bereits Untersuchungen zur Eignung von *C. butyricum* NRRL B-1024 als potenzieller Buttersäureproduzent durchgeführt (SHARPELL und STEGMANN 1980). Die wichtigsten Eigenschaften von *C. butyricum* sind in der folgenden Aufstellung aufgeführt (HOLT et al.).

Form und Verhalten	:	stäbchenförmig, beweglich
Länge	:	~ 5 bis 10 µm (pleomorph)
Durchmesser	:	~ 1 bis 2 µm (pleomorph)
Sporen	:	bildet Endosporen
Gramverhalten	:	positiv
O <sub>2</sub> -Verhältnis	:	strikt anaerob
Stoffwechsel	:	saccharolytisch, keine Sulfatreduktion, keine Katalase- oder Oxidaseaktivität



**Abbildung 4-1:** Mikroskopische Aufnahme einer Reinkultur von *C. butyricum* NRRL B-1024 mit Endosporen (Pfeile).

#### 4.7.2 IK 96, IK 123, IK 124

Bei den verwendeten Stämmen IK 96, IK 123 und IK 124 handelte es sich um Stämme, die am Institut für Technologie und Biosystemtechnik der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft im Rahmen eines Screenings nach bisher unbekannten 1,3-Propandiol bildenden *Clostridien* von Frau Dipl.-Biol. Ilona Koschik gefunden wurden. Bei IK 96 handelte es sich, wie während der weitergehenden Untersuchungen festgestellt, nicht um eine Reinkultur. Der in der Mischkultur IK 96 enthaltene 1,3-Propandiolbildner wurde nach der Isolierung als IK 124 bezeichnet.

## 4.8 Stammhaltung

### 4.8.1 *Clostridium butyricum* NRRL B-1024

Die Stammhaltung von *C. butyricum* NRRL B-1024 erfolgte in der Anaerobierbank. Bewachsene Kulturen von *C. butyricum* NRRL B-1024 in Mineralsalzmedium wurden anaerob bei Raumtemperatur gelagert. Diese Kulturen wurden im Abstand einiger Wochen mit 5 bis 10 % (v/v) auf frisches Medium überimpft, bei 35 °C in MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>PG<sup>25</sup> über Nacht inkubiert und anschließend wieder bei Raumtemperatur anaerob gelagert. In größeren zeitlichen Abständen wurden Glycerinkulturen für die Dauerkonservierung des Stammes angelegt.

## 4.9 Analytik

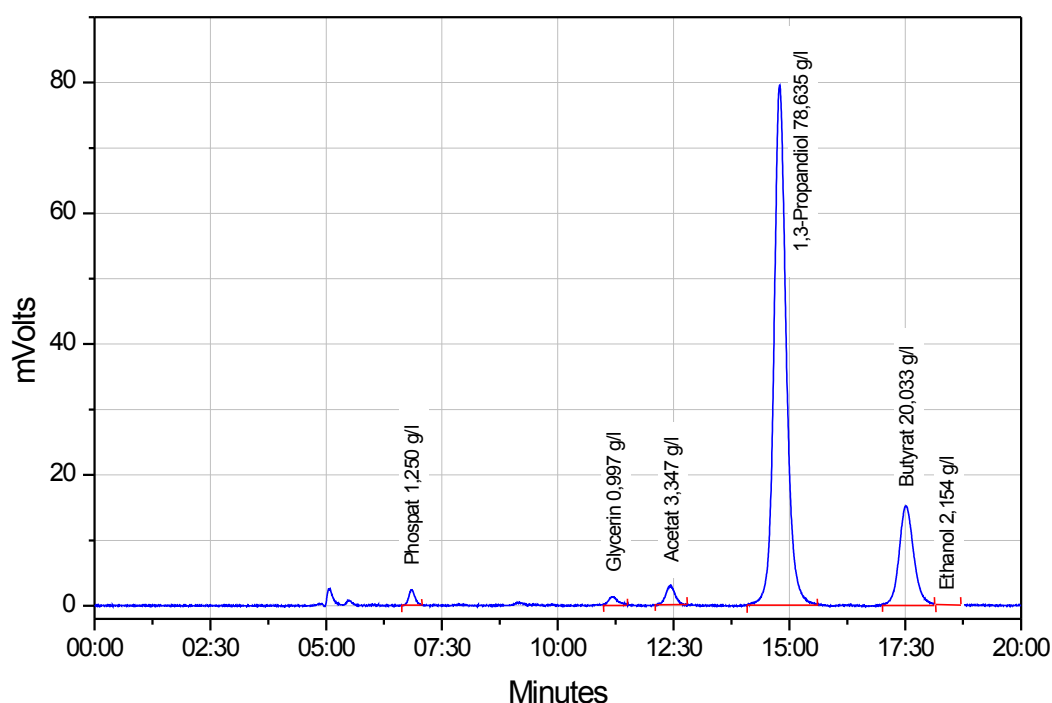
Zur Probenvorbereitung wurden die Proben für 5 Minuten bei 14.000 min<sup>-1</sup> im 1,5-mL Reaktionsgefäß zentrifugiert (Modell 5417, Eppendorf Gerätebau, Engelsdorf). Die Analyse der Fermentationsprodukte erfolgte dann mittels HPLC. Zur Absicherung wurden die Endkonzentrationen der Fermentationen mittels GC überprüft.

### 4.9.1 HPLC

Die Chromatographie erfolgte mit den in Tabelle 4-3 beschriebenen Komponenten unter Verwendung einer sulfonierten Divinylbenzenstyren-Copolymer Säule (Aminex HPX-87H; Fa. Bio-Rad, Hercules, CA, USA) mit 5 mM Schwefelsäure als Laufmittel bei einer Flussrate von 0,7 ml · min<sup>-1</sup>, 60 °C und 55-60 bar. Die Erfassung und Auswertung der Chromatogramme erfolgte über einen PC mit der Software Chromgate<sup>®</sup> (Knauer, Berlin). Ein Beispielchromatogramm ist in Abbildung 4-2 zu sehen.

**Tabelle 4-3:** Komponenten des verwendeten HPLC-Systems

Degasser	4-Kanal Knauer, Berlin
Pumpe	K-1001 Knauer, Berlin
Autosampler	Spark Marathon
Säulenofen	W. O. Electronic
RI-Detektor	K-2301 Knauer, Berlin
Interfacebox	Knauer, Berlin

**Abbildung 4-2:** Beispielchromatogramm der HPLC-Analytik

#### 4.9.2 GC

Die gaschromatographischen Analysen erfolgten mittels eines GC 14A und Autosampler AOC-17 (Shimadzu, Duisburg) mit FID ( $H_2$ /Luft). Die Auswertung erfolgte mit der Software GC 10 (Shimadzu, Duisburg). Die Trennung erfolgte mittels einer Cpwax57CB Kapillarsäule. Bei der Analyse wurden die folgenden Einstellungen verwendet:

Injektor: 220 °C

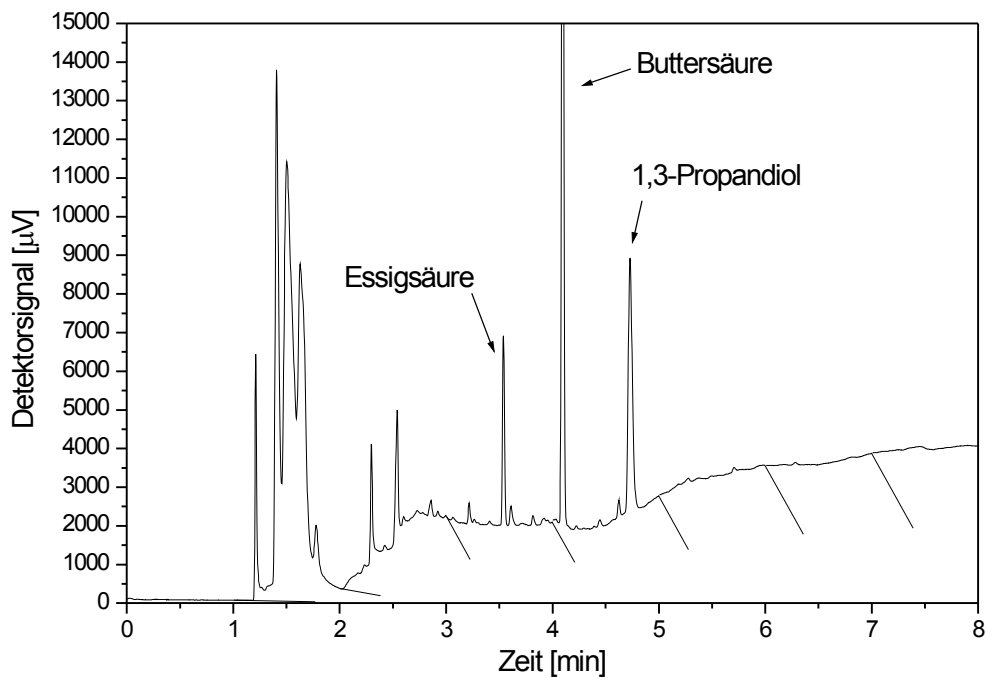
Detektor: 200 °C

Split: 10

Temperaturprogramm: 70 °C für 2 min, dann mit 40 °C/min auf 180 °C,  
180 °C für 3,3 min

Druckprogramm: 12 kPa für 2 min, mit 40 kPa/min auf 40 kPa,  
40 kPa für 5,3 min

Die Konzentrationsberechnungen erfolgten über die Peakflächen. Ein Beispielchromatogramm ist in Abbildung 4-3 zu sehen.

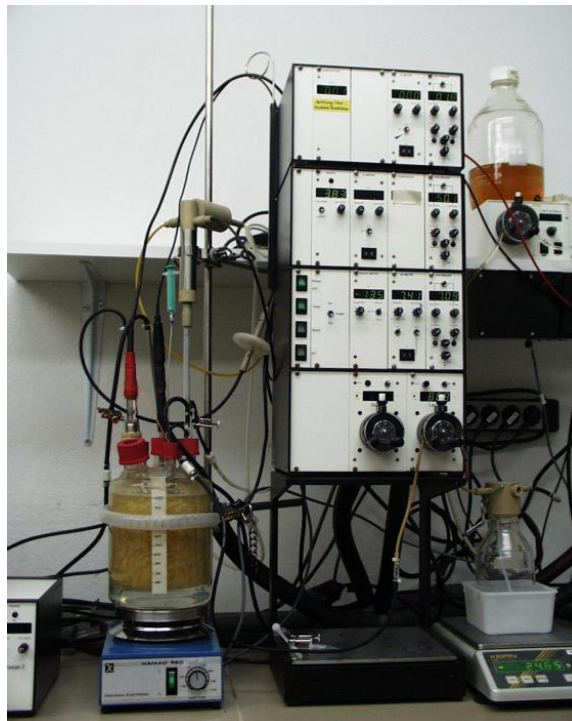


**Abbildung 4-3:** Beispielchromatogramm der GC-Analytik

## 4.10 Verwendete Fermentersysteme

Im Verlauf der Arbeit wurden drei unterschiedliche Fermentergrößen verwendet, es wurden Fermentationen im 1, 10 und 200 L Maßstab durchgeführt. Dabei wurden unterschiedliche Fermentersysteme verwendet. Die 10 und 200 L Fermentationen erfolgten in Edelstahl-Fermentern der Firma Bioengineering. Die 10 L Fermentationen wurden in einem 19 L Fermenter durchgeführt, für die 200 L Fermentation in einem 400 L Fermenter.

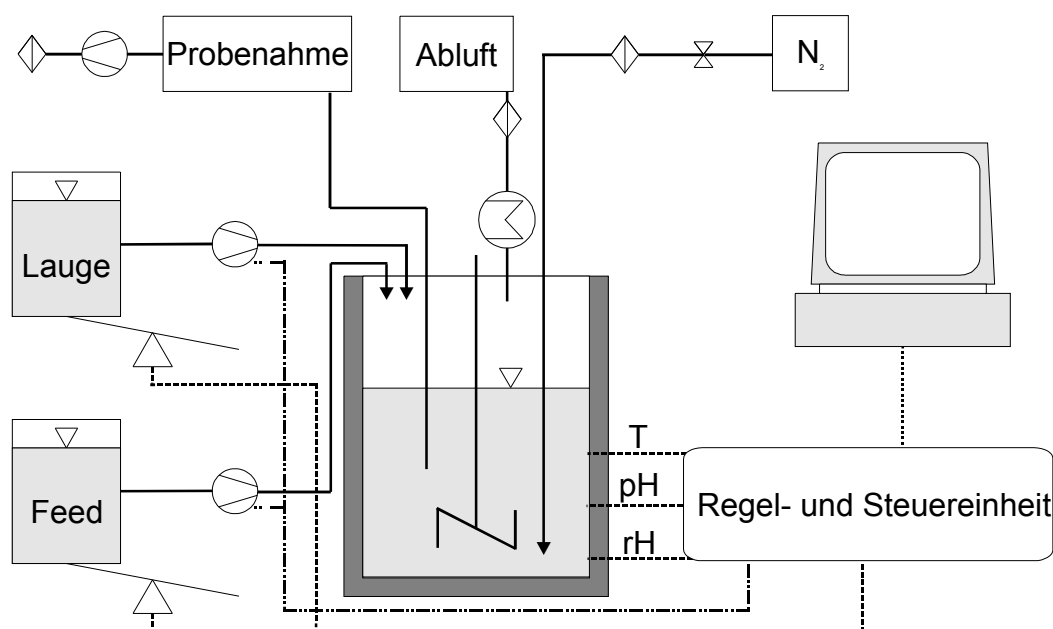
### 4.10.1 1-Liter-Massstab



**Abbildung 4-4:** 1 L Glasfermenter mit Regel- und Steuereinheit der Firma Merodos

Begonnen wurde diese Arbeit mit einem Laborfermentersystem (Abbildung 4-4) auf Basis eines thermostatisierbaren Glasgefäßes und einer Regel- und Steuereinheit der Firma Merodos, welche die Messsignale der Sensoren zur Aufzeichnung durch einen PC aufbereitete und als Analogsignale zur A/D-Wandlerkarte des Computers übertrug. Die pH-Regelung erfolgte durch den pH-Regler der Regel- und Steuereinheit. Die Aufzeichnung erfolgte mit DasyLab®, einer grafisch

programmierbaren Software zur Messwerterfassung, Steuerung und Regelung. Der Aufbau des Fermentersystems ist schematisch in Abbildung 4-5 dargestellt. Die Thermostatisierung des Fermenters erfolgte über einen Thermostaten (Julabo FP35, Seelbach), die Abluftkühlung durch einen Kryostaten (Julabo F25, Seelbach). Die Feed-Zudosage erfolgte durch Parallelschaltung der Feedpumpe mit der Laugenpumpe. Das Dasylab<sup>®</sup>-Schaltbild für diesen Aufbau ist in Abbildung 9-2 und Abbildung 9-3 im Anhang dargestellt.



**Abbildung 4-5:** Schematischer Aufbau des Fermentersystems auf Basis der Regel- und Steuereinheit der Firma Meredos

#### 4.10.2 Umbau des 1-Liter-Fermentersystems

Da die Regel- und Steuereinheit der Firma Meredos (Abbildung 4-4) keine Möglichkeiten zur Erweiterung vorsah, bestand auch keine Möglichkeit, ereignisabhängig und automatisch (in Abhängigkeit von Online-Analyseergebnissen) in das Regelverhalten einzugreifen. Eine Anbindung einer Online-Analytik war damit nicht möglich. Es wurde beschlossen, die Regel- und Steuereinheit durch unabhängige Einzelkomponenten zu ersetzen und die Regelung über den Computer zu realisieren. Da den aus den bisher durchgeführten Experimenten gewonnenen Daten des Redoxpotentials keine bedeutsamen Erkenntnisse entnommen werden

konnten, wurde auf die Messung in der Folge verzichtet. Es standen also noch die in Tabelle 4-4 aufgeführten Punkte zur Verwirklichung an.

**Tabelle 4-4:** Schnittstellen zwischen Fermenter und Computer

Messwerterfassung:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pH-Wert</li> <li>- Fermentertemperatur</li> <li>- Laugenwaage</li> <li>- Feedwaage</li> </ul>
Ansteuerung:	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Laugenpumpe (pH-Regelung)</li> <li>- Feedpumpe</li> </ul>

Um dies mit einem minimalen Kostenaufwand zu erreichen, wurde die Verwendung von bereits vorhandenem Equipment überprüft. Der Computer war mit einer 16-Kanal A/D-Wandlerkarte (Adlink, PCI-9112) ausgestattet, die zusätzlich über zwei Analogausgänge verfügte. Als auswertbare Messsignale mussten also Spannungen im Bereich von 0 bis 10 V bereitgestellt werden, damit der Computer die Messdaten erfassen und verarbeiten konnte. Alternativ wäre auch eine Erfassung über serielle oder parallele Schnittstellen des Computers im Bereich des Möglichen, da eine eingebaute serielle Schnittstellenkarte die Zahl der zur Verfügung stehenden seriellen Schnittstellen auf 6 erhöhte. Da der Glasfermenter als ganzes autoklaviert wurde, war zu beachten, dass die pH-Elektrode und der Temperatursensor entweder autoklavierbar sein oder nach dem Autoklavieren steril einbaubar sein mussten. Die Lösungen dieser Aufgaben sind in den folgenden Kapiteln beschrieben.

#### **4.10.2.1      pH-Wert**

Als pH-Elektroden wurden autoklavierbare Gelelektroden (Mettler-Toledo, Gießen) eingesetzt. Als Messumformer wurde auf pH-Meter von WTW zurückgegriffen, welche über einen Schreiberausgang verfügten. Dieser wurde mit der A/D-Wandlerkarte des Computers verbunden.



#### **4.10.2.2 Temperatur**

Da die kommerziell erhältlichen autoklavierbaren Temperaturelektroden relativ teuer sind, wurde eine Alternativlösung erarbeitet, die die Verwendung preisgünstiger Pt<sub>100</sub>-Messfühler erlaubte. In den Fermenter wurde ein dünnwandiges Glasrohr, welches an einem Ende verschlossen ist (zum Beispiel ein Festkörper-NMR-Röhrchen), eingebaut, in welches nach dem Autoklavieren der Messfühler eingeführt wurde. Zum besseren Wärmeübergang zwischen Glasrohrwandung und Temperaturfühler wurde vor dem Einsetzen des Temperaturfühlers ein Tropfen Glycerin in das Glasröhrchen gegeben. Der Pt<sub>100</sub>-Messfühler wird an einen Messumformer (LKM 104, 0-100 °C, Geratherm, Geschwenda) angeschlossen, welcher für die Signalumwandlung in ein Spannungssignal (0-10 V) sorgt. Der Messumformer wurde mit der A/D-Wandlerkarte des Computers verbunden.

#### **4.10.2.3 Waagen**

Es standen zwei Laborwaagen mit serieller Ausgabemöglichkeit des Waagenwertes zur Verfügung, die mit den seriellen Schnittstellen des PCs verbunden werden konnten. Solange das Fermentersystem mit zwei Waagen auskam, war die Überwachung der Laugen- und Feedzugabe damit problemlos möglich. Da aber eine Erweiterung des Fermentersystems auf zwei parallel betriebene Fermenter angestrebt wurde, um die Möglichkeit von parallel betriebenen Vergleichsfermentationen zu ermöglichen, musste eine Lösung gefunden werden, mit geringem Geldaufwand vier Waagen zur Verfügung zu haben. Realisiert wurde dies durch den Selbstbau von Waagen basierend auf Kraft-Messstreifen (KT 2000 K 50N 2405D, Megatron, Putzbrunn). Diese sind preiswert und geben ein Spannungssignal, welches über die A/D-Wandlerkarte im Computer ausgewertet werden kann.

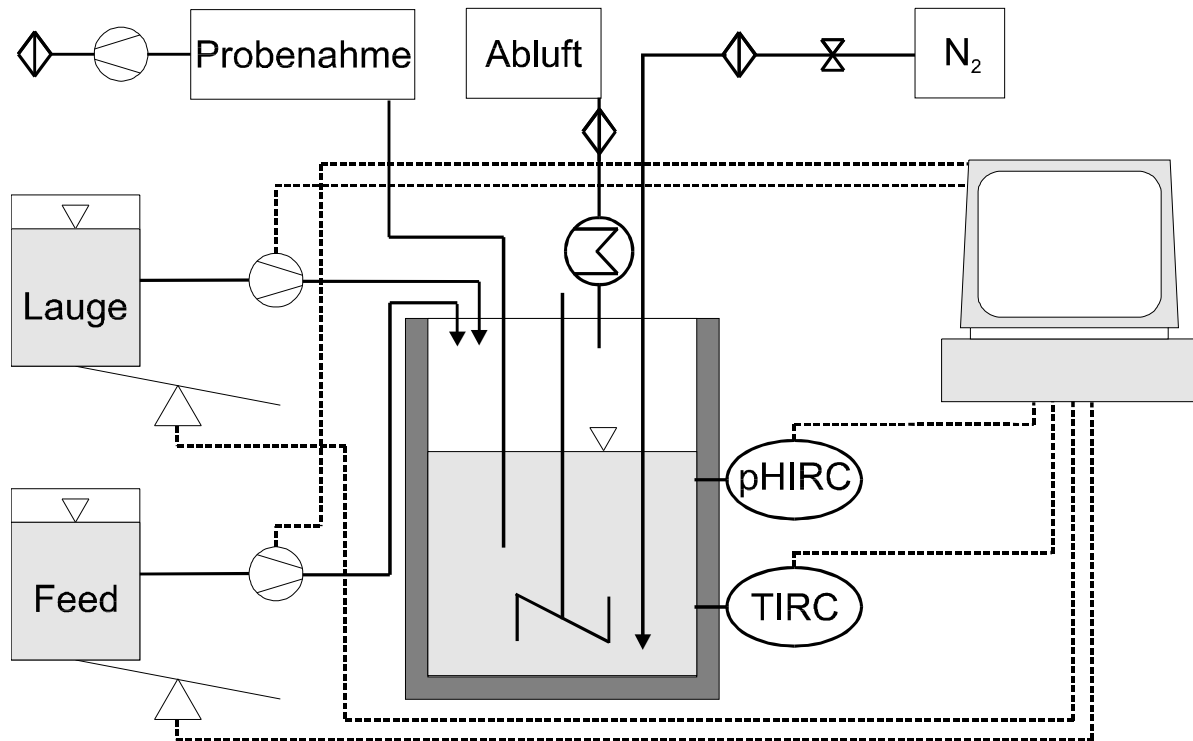
#### 4.10.2.4 Pumpen

Die Regulierung des pH-Wertes und die Zudosage des Feeds sollten automatisch vom PC gesteuert erfolgen. Dazu war es nötig, die entsprechenden Pumpen vom PC aus anzusteuern. Für die Ansteuerung von Pumpen standen zwei Wege zur Auswahl. Entweder das An- und Abschalten der Stromversorgung der Pumpen bei Verwendung von vorhandenen Schlauchpumpen oder die Anschaffung ansteuerbarer Schlauchpumpen. Die Verwendung von Schlauchpumpen ergab sich aus der Bedingung des sterilen Arbeitens, da der Pumpenschlauch von der Pumpe getrennt werden und durch Autoklavieren sterilisiert werden kann. Auch die Wahlmöglichkeit zwischen verschieden dimensionierten Schläuchen ist ein Vorteil, da so eine einfache Anpassung bei Änderungen des zu leistenden Pumpvolumens realisierbar ist. Die Methode der Pumpensteuerung durch An- und Abstellen wurde verworfen, da es sich zeigte, dass fast alle vorhandenen Schlauchpumpen eine Verzögerung zwischen Anschalten der Stromversorgung und Anlaufen zeigten. Diese Verzögerung war bei jeder Pumpe unterschiedlich lang und auch nicht reproduzierbar. Um die Folgen, die sich daraus für eine exakte Ansteuerung ergeben hätten, zu vermeiden und da diese Methode auch keinen Eingriff auf die Pumpgeschwindigkeit zuließ, wurde die Anschaffung von ansteuerbaren Schlauchpumpen beschlossen. Der Markt der erhältlichen ansteuerbaren Schlauchpumpen teilt sich in zwei große Gruppen, die sich durch die Art der Ansteuerung unterscheiden. Die eine Gruppe lässt sich direkt über eine serielle Schnittstelle des Computers ansprechen und erlaubt bei Verwendung definierter Schläuche ein direktes Ansprechen. Der Befehl „pumpe 5 ml“ wird von der Pumpe ausgeführt, die Umsetzung von Volumen in Pumpzeit wird von der Steuerelektronik der Pumpe erledigt. Dies setzt natürlich eine entsprechende Ausstattung der Pumpe voraus, welche sich deutlich in den Anschaffungspreisen niederschlägt. Bei der zweiten Gruppe der ansteuerbaren Pumpen erfolgt die Steuerung der Pumpen über Spannungssignale, Stromstärke oder Kurzschlusskontakte. Diese Pumpen sind deutlich preiswerter, und viele von ihnen sind mit unterschiedlichen Pumpenschläuchen verwendbar, die Wahl des Pumpenschlauches wird nur durch einen maximalen Schlauchdurchmesser und eine maximale Wandstärke begrenzt. Dies ermöglicht die Verwendung von nach den Anforderungen ausgewählten, in diesem Fall autoklavierbaren und laugenstabilen Schläuchen. Es wurden Ismatec

Eco-Line VC-360 Pumpen angeschafft, da diese eine umfassende Ansteuerbarkeit (Pumpe an/aus und Drehrichtung über Kurzschlusskontakt, Pumpengeschwindigkeit entweder über Spannung oder Geräteregele) bei niedrigem Preis gewährleisten und durch den Pumpkopf mit drei Rollen relativ pulsationsfrei sind. Diese Pumpen können mit einfachen Meterware-Schläuchen betrieben werden, solange diese eine Wandstärke von 1,6 mm haben. Zur Ansteuerung einer Pumpe waren 3 Signale nötig. Je ein Kurzschlusskontakt für An/Aus und die Drehrichtung und eine Spannung im Bereich 0 bis 5 V zur Steuerung der Geschwindigkeit in % der Pumpenleistung. Für vier Pumpen mussten also 12 Analogsignale durch den PC erzeugt werden können, dies wurde durch den zusätzlichen Einbau einer D/A-Wandlerkarte (Adlink, PCI-6216V) erreicht. Die Kurzschlusskontakte wurden unter Verwendung von Printrelais (291 97 10, RS-Components, Mohrfelden-Walldorf) und einem Standard-TTL Baustein (SN7406, RS-Components, Mohrfelden-Walldorf) mittels einer selbst gebauten Schaltung (Abbildung 9-1) realisiert.

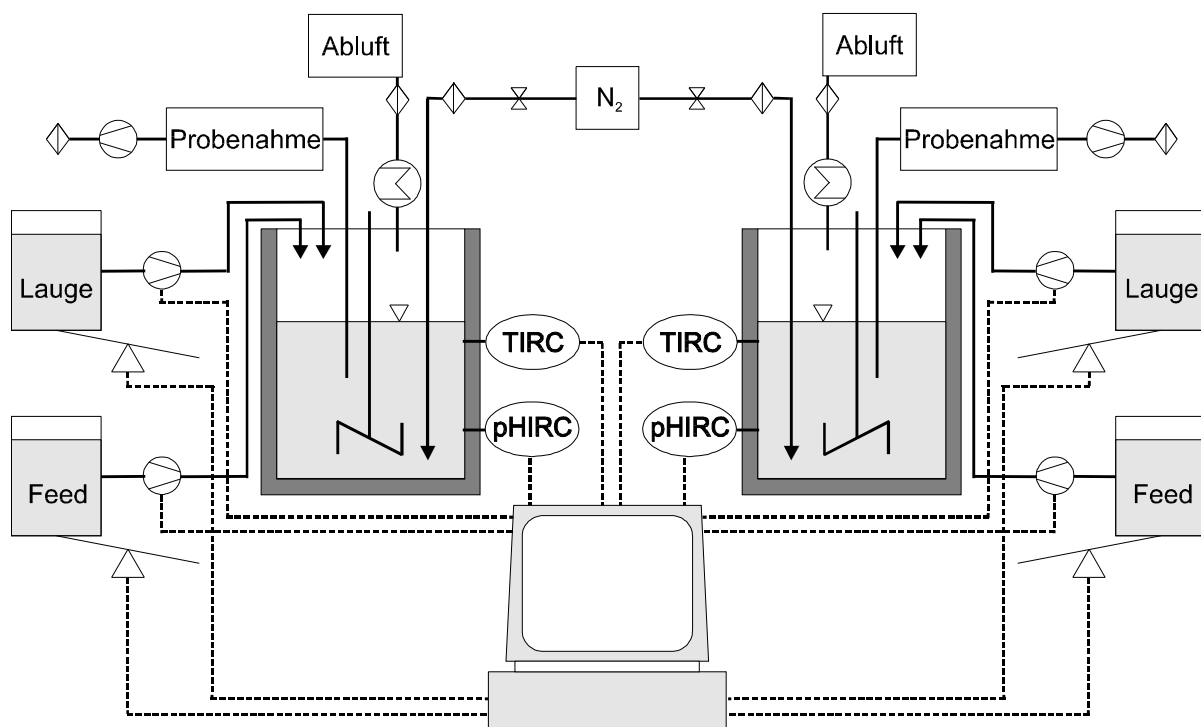
#### **4.10.3 Computergesteuerter 1-Liter-Fermenter**

Nachdem die in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Änderungen realisiert waren, ergab sich für den Fermenter der in Abbildung 4-6 dargestellte schematische Aufbau. Der Computer übernahm die Datenerfassung und die Ansteuerung der Laugen- und Feed-Pumpe. Das entsprechende DasyLab<sup>®</sup>-Schaltbild ist in Abbildung 9-5 und Abbildung 9-4 dargestellt. Die Zudosage des Feeds war an die Laugenpumpe gekoppelt und konnte nur durch die Wahl der Geschwindigkeiten von Laugen- und Feed-Pumpe beeinflusst werden.



**Abbildung 4-6:** Computergesteuerter 1-Liter-Fermenter (schematischer Aufbau)

#### 4.10.4 Computergesteuertes 1-Liter-Doppel-Fermentersystem



**Abbildung 4-7:** Schematischer Aufbau des Doppel-Fermentersystems

Eine einfache Verdoppelung des Systems führte zum Doppel-Fermentersystem (Abbildung 4-7). Mit diesem System war es möglich, zwei Fermentationen gleichzeitig durchzuführen. Dies erlaubte Untersuchungen mit Referenzansatz oder die gleichzeitige Überprüfung zweier Parameter. Das entsprechende DasyLab<sup>®</sup>-Schaltbild ist in Abbildung 9-6 und Abbildung 9-4 dargestellt.

#### **4.10.5 Computergesteuertes Fermentersystem mit online HPLC**

Ziel dieser Arbeit war es, ein automatisches Fermentersystem mit angeschlossener online-Analytik zu realisieren. Nachdem die Computersteuerung für das Fermentersystem realisiert war (siehe 4.10.3 und 4.10.4), musste noch der online-Analytikteil realisiert werden. Dafür waren die folgenden Aufgabenstellungen zu lösen:

- HPLC taugliche Probenahme
- aus DasyLab<sup>®</sup> ansteuerbares 6-Port-Ventil
- automatisches Füllen der Probenschleife
- aus DasyLab<sup>®</sup> gesteuerter Start der HPLC-Messungen
- Transfer der HPLC-Ergebnisse nach DasyLab<sup>®</sup>

Die Realisierung der einzelnen Punkte wird in den folgenden Kapiteln dargestellt.

##### **4.10.5.1 Probenahme**

Für die HPLC-Analytik ist es notwendig, partikelfreie Proben zu haben. Dies wird durch Zentrifugieren (siehe 4.9) oder Filtrieren erreicht. Da die Probenvorbereitung automatisch erfolgen sollte, musste ein Weg gefunden werden, einen Filtrationsschritt zwischen Fermenter und HPLC zu schalten. Auf dem Markt etabliert

sind zwei Verfahren zur sterilen Filtration von Fermentationsmedien. Die externen Verfahren (außerhalb des Fermenters) arbeiten mit Querstrom- oder Kapillarfiltration. Dabei wird das Fermentationsmedium im Kreislauf durch das Filtrationsmodul gepumpt. Durch hohe Fließraten im Kreislauf und die dadurch auftretenden hohen Scherkräfte an der Membran wird ein Verstopfen der Membran verhindert. Vorteil dieser Systeme ist die Möglichkeit, große Filtratströme zu realisieren. Nachteil ist der technische Aufwand und die in den Filtrationsmodulen auftretenden Scherkräfte. Bei diesen Systemen muss ein Mediumskreislauf zwischen Fermenter und Filtrationsmodul realisiert werden, in dem mit hohen Durchflussraten das Fermentationsmedium durch das Filtrationsmodul gepumpt wird. Durch die dabei auftretenden hohen Scherkräfte kommt es zur Zerstörung der Zellen. Die internen Verfahren basieren auf einer Platzierung der Filtrationsmembrane im Fermenter. Die bei diesen Verfahren zur Anwendung kommenden Filtrationsmodule werden so in den Fermenter eingebaut, dass sie sich möglichst in der turbulenten Zone in der Nähe des Rührers befinden. Bei diesen Systemen übernimmt der Rührer des Fermenters neben der Durchmischung des Fermenterinhalt zusätzlich die Aufgabe, die Filtrationsmembrane frei zu spülen. Diese Systeme haben den Vorteil, ohne einen größeren apparativen Aufwand auszukommen. Das Filtrationsmodul wird mit dem Fermenter sterilisiert, und es ist auch keine Pumpe nötig, um das Medium durch ein Filtrationsmodul zu pumpen. Der Nachteil dieser Systeme ist die durch die kleine Oberfläche der Filtrationsmembrane begrenzte Filtrierleistung.

Da das Arbeitsvolumen des Laborfermentersystems auf 600 bis 800 ml konzipiert war, kamen die externen Verfahren nicht in Frage, da auch bei den kleinsten Filtrationsmodulen Kreislaufströme von mindestens  $5 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$  nötig sind, um ein Zusetzen der Membranen zu verhindern. Dies hätte bedeutet, den Fermenterinhalt mindestens 6 mal pro Stunde durch das Filtrationsmodul zu pumpen.

Kommerziell erhältliche Filtrationssonden sind relativ teuer, deshalb wurde ein Eigenbau entwickelt. Die Probenahmesonde besteht aus einem speziellen PEEK-Körper (siehe Abbildung 9-12), welcher zur Aufnahme der  $0.2 \mu\text{m}$  2" Keramik Membran (Flownamics, Madison, WI, USA) dient, einem 12 mm Edelstahlrohr mit innen liegendem M10 Gewinde und einer 0,5 mm HPLC-Kapillare sowie einigen O-Ringen und HPLC-Verschraubungen. Die Keramik Membran wird dabei mittels zweier O-Ringe auf dem PEEK-Körper verschraubt. Der Anschluss für die HPLC-Kapillare wurde so gestaltet, dass die Kapillare mit einer Kombination aus Super

Flangeless<sup>®</sup> Ferrule (P-260x Upchurch, Oak Harbor, WA, USA) und M6 Super Flangeless<sup>®</sup> Nut (P-293, Upchurch, Oak Harbor, WA, USA) eingeschraubt werden kann. Das andere Ende der Kapillare wird mit einer tottraumarmen HPLC-Verschraubung (Techlab, Erkerode) versehen. Das Edelstahlrohr wird mit einem O-Ring als Dichtung auf den PEEK-Körper geschraubt. Es dient dazu, die Probenahmesonde zu verlängern und damit einen Einbau in vorhandene 12 mm Verschraubungen am Fermenterdeckel zu erlauben. Abbildung 4-8 zeigt eine der so konstruierten Probenahmesonden mit Verschraubung für den Einbau im Fermenterdeckel.



**Abbildung 4-8:** Probenahmesonde mit Fermenterverschraubung

#### **4.10.5.2 6-Port-Ventil**

Der Anschluss des Fermentersystems an die HPLC wurde mit einem elektrischen 6-Port-Ventil (WellChrom K-6, Knauer, Berlin) realisiert, welches sich über eine serielle Schnittstelle ansteuern lässt und damit von DasyLab<sup>®</sup> geschaltet werden kann. Es wurde eine 5 µl Probenschleife gewählt, um die Substanzmengen in einem messbaren Bereich zu halten.

#### **4.10.5.3 Füllen der Probenschleife**

Das Füllen der Probenschleife des 6-Port-Ventil übernimmt eine Ismatec Eco-Line VC-360 Schlauchpumpe, deren Pumpenschlauch mit Hilfe von Adaptern (P-663, Upchurch, Oak Harbor, WA, USA) mit Probenahmesonde und 6-Port-Ventil

verschraubt wird. Die Ansteuerung der Schlauchpumpe und die dazu nötige Schaltung sind bereits in Kapitel 4.10.2.4 beschrieben.

#### **4.10.5.4 Extern gesteuerter Start der HPLC-Messungen**

Der extern gesteuerte Start der HPLC-Messungen war einfach zu realisieren. Auch wenn keine direkte Methode existiert, um die HPLC-Software Chromgate® durch andere Software, in diesem Fall Dasylab® anzusteuern, ist doch die Möglichkeit des Starts einer in Chromgate® programmierten Messung über einen Kurzschlusskontakt vorgesehen. Das verwendete 6-Port-Ventil (WellChrom K-6, Knauer, Berlin) ist mit einem Kurzschlusskontakt ausgestattet. Dieser wurde mit der Interfacebox (Knauer, Berlin) verbunden und die HPLC-Methode entsprechend erstellt. Ein Schalten des 6-Port-Ventils in Injekt-Position führte damit zum Start der HPLC-Messung. Vor Beginn der Fermentationsexperimente musste nur noch eine ausreichend große Anzahl an HPLC-Messungen vorprogrammiert werden.

#### **4.10.5.5 Transfer der HPLC-Ergebnisse nach Dasylab®**

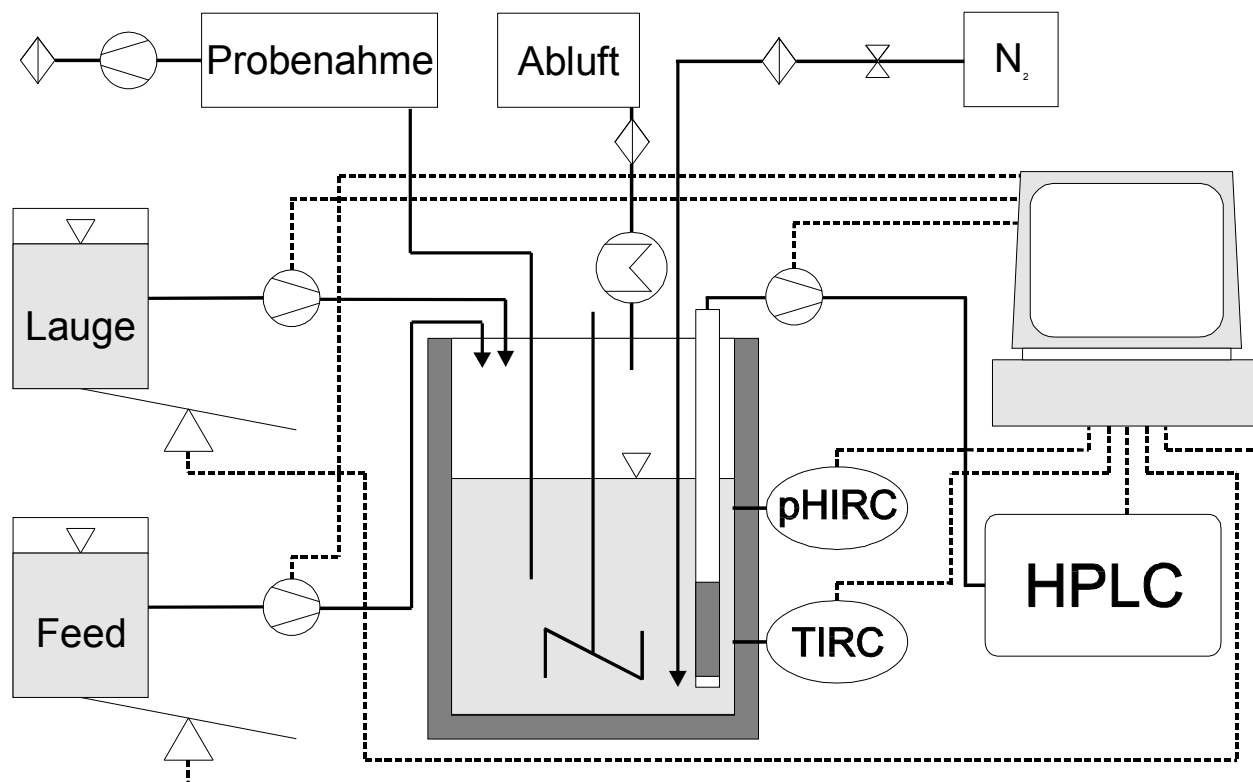
Ziel der online-Analytik war es, die Messergebnisse der HPLC zur Steuerung des Fermentationsprozesses heranzuziehen. Dazu mussten die Ergebnisse der HPLC-Software in die Steuerungs- und Regelungssoftware Dasylab® überführt werden. Da keine direkte Möglichkeit bestand, aus Dasylab® auf die Ergebnisse der HPLC-Analytik zuzugreifen, musste dies über einen Umweg bewerkstelligt werden. Die HPLC-Software Chromgate® bietet zwei Optionen, die hierfür hilfreich sind. Erstens die Möglichkeit, das Messergebnis als ASCII-Datei abzuspeichern, und zweitens die Möglichkeit des Aufrufes eines externen Programms nach dem Ende der Messung. Die Ausgabe des Messergebnisses in eine ASCII-Datei führt zu eine Datei, die folgendermaßen aufgebaut ist: Nach einem einleitenden Kopf erfolgt eine Aufzählung der Messparameter und Messwerte. Die Reihenfolge ist dabei: Datum, Uhrzeit, Probenname, Dateiname, Messmethode, Nutzer, Vial, Volumen, Autosamplerprogramm, gefolgt von den Messwerten nach Retentionszeit geordnet. Die Datei wird automatisch nach der verwendeten Methode benannt und weitere Messergebnisse



werden an diese Datei angehängt. Ein Beispiel für das Aussehen dieser Dateien ist im Anhang unter 9.2.1 gegeben.

Dasylab<sup>®</sup> verwendet aber ein komplett anderes Dateiformat. Ein Beispiel für dieses ist im Anhang unter 9.2.2 dargestellt. Um dieses Problem zu lösen, wurde das Programm HPLC2Dasylab geschrieben, welches die Umwandlung vornimmt. Das Programm extrahiert die letzten 3 Werte aus der Datei und schreibt eine Dasylab<sup>®</sup> konforme ASCII-Datei. Die erzeugten ASCII-Dateien werden dabei fortlaufend durchnummeriert. Diese Dateien können nun mit dem Datei-Lesen-Modul in Dasylab<sup>®</sup> eingelesen und verarbeitet werden. Der Einlesevorgang wird 4 Minuten nach dem Ende der HPLC-Messung gestartet und die Konzentrationen als globale Variable abgelegt.

Nachdem die in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Änderungen realisiert waren, ergab sich für den Fermenter der in Abbildung 4-9 dargestellte schematische Aufbau.



**Abbildung 4-9:** Schematischer Aufbau des automatischen Fermentersystems mit online-HPLC

#### **4.11 Bestimmung des Totvolumens des Probenahmesystems**

Um zu bestimmen, wie lang das Pumpintervall zum Füllen der Probenschleife sein muss, wurde ein Test zur Quantifizierung des Totvolumens des Probenahmesystems durchgeführt. Dazu wurde die Probenahmesonde ausreichend mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend wurde die Probenahmesonde in ein Becherglas mit einer Glycerinlösung (Konzentration  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Glycerin) gestellt und die Probenahme für einen definierten Zeitraum gestartet. Dann wurde eine HPLC-Messung gestartet. Im Anschluss an die HPLC-Messung wurde das Probenahmesystem erneut mit destilliertem Wasser gespült, bis das Probenahmesystem glycerinfrei war. War die mit der HPLC gemessene Konzentration kleiner als  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Glycerin, so musste das Pumpintervall verlängert werden. Lag die gemessene Konzentration bei  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , so konnte das Pumpintervall verkürzt werden. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis das minimale Pumpenintervall ermittelt war. Für die online-HPLC-Messungen bei den Fermentationen wurde ein etwas längerer Zeitraum gewählt. Nachdem das Pumpenintervall bestimmt war, wurde das Probenvolumen bestimmt.

#### **4.12 Fermenterfernüberwachung via D-Netz**

Da auch bei der automatischen Fermentation eine regelmäßige Kontrolle des Fermentationsablaufs notwendig blieb, um auf unvorhergesehene Störungen des Systems oder geänderte Fermentationsverläufe durch starke Auswirkungen der untersuchten Parameter reagieren zu können, wurde ein System zur Fermenterfernüberwachung entwickelt. Um eine Kontrolle des Fermenters ohne direkte Anwesenheit zu erlauben, wurde das Programm zur Umwandlung der HPLC-Daten in Dasylab<sup>®</sup>-Dateien (siehe 4.10.5.5) erweitert. Es wurde der Versand der Messwerte per Email eingebaut, der bei Nutzung der Email-aufs-Handy Funktion eine Überwachung des Fermentersystems von überall innerhalb des Mobilfunknetzes erlaubte.

### 4.13 Regelung des Glycerinfeeds

Für die Aufarbeitung des 1,3-Propandiols ist es günstiger, wenn der Glyceringehalt am Ende der Fermentation auf Null absinkt. Da außerdem hohe 1,3-Propandiolkonzentrationen in Verbindung mit hohen Glycerinkonzentrationen hemmend auf das Zellwachstum und die damit verbundene 1,3-Propandiolproduktion wirken, wurde eine im Verlauf der Fermentation abnehmende Glycerinkonzentration angestrebt. Dazu wurden in das DasyLab<sup>®</sup>-Schaltbild zwei Module eingefügt. Das Modul PDWertanalyse (Abbildung 9-10), welches die 1,3-Propandiolkonzentration überprüft und daraus die Glycerin-Sollkonzentration ermittelt, und das Modul P-Regler Glycerin (Abbildung 9-11) welches bei Unterschreiten der Sollkonzentration an Glycerin eine Zudosage in Abhängigkeit von der Konzentrationsdifferenz auslöst. Der Sollwert für Glycerin wurde dabei in fünf Stufen angepasst. Bis  $65 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  1,3-Propandiol lag der Sollwert bei  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Glycerin, zwischen  $65$  und  $75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  1,3-Propandiol bei  $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Glycerin, zwischen  $75$  und  $85 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  1,3-Propandiol bei  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Glycerin, zwischen  $85$  und  $95 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  1,3-Propandiol  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Glycerin und bei über  $95 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  1,3-Propandiol wurde eine Glycerin Sollkonzentration von  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  vorgegeben.

### 4.14 Verwendung von Phosphat als internen Standard

Da es im Verlauf der Fermentationen manchmal zu fehlerhaften HPLC-Ergebnissen kam, wurde, um Auswirkungen dieser zu niedrigen Messwerte auf den Fermentationsverlauf zu verhindern, eine Plausibilitätsprüfung in das HPLC2DasyLab Programm (siehe 9.2.3) integriert. Die Ursache dieser Fehler ließ sich auf das Ausgasen von gelösten Gasen im Probenahmesystem zurückführen, durch welche eine nur teilweise gefüllte Probenschleife hervorgerufen wurde. Die HPLC-Analyse wurde deshalb um den Wert für Phosphat erweitert. Da die Phosphatkonzentration über den Fermentationsverlauf relativ konstant blieb, konnte sie als interner Standard verwendet werden. Das HPLC2DasyLab Programm überprüft, ob die gemessene Phosphatkonzentration mindestens 80 % der vorgegebenen Sollkonzentration beträgt und erhöht, wenn dies nicht der Fall ist, die gemessenen Konzentrationen um

den Faktor Sollwert/gemessener Wert. Der Phosphatsollwert wird dem Programm dabei als Kommandozeilenparameter übergeben.

#### **4.15 Vorbereitung des 1-Liter-Fermenters**

Der Fermenter wurde mit 800 ml destilliertem Wasser befüllt. Im Anschluss wurde die pH-Elektrode kalibriert und in den Fermenter eingeschraubt. Die Schlauchverbindungen zum Fermenter wurden abgeklemmt und die Schlauchenden mit Aluminium-Folie umwickelt. Dann wurde der Fermenter inklusive aller angeschlossenen Zu- und Ableitungen, pH-Elektrode und Probennahmesonde (wenn verwendet) in einen Autoklaven (Fedegari, Albuzzano, Italien) verbracht. Nach dem Sterilisieren wurde das Wasser über die manuelle Probennahme unter Stickstoffüberdruck aus dem Fermenter gepumpt und das sterile anaerobe Medium durch Anlegen eines Stickstoff-Überdrucks in den Fermenter gefüllt. Nun wurde der Abluftkühler mit dem Kryostaten verbunden. Die Schläuche wurden in die Schlauchpumpen eingelegt und mit den Vorratsbehältern verbunden. Nach dem Anschließen der Elektroden und der Probennahmesonde wurde der Thermostat mit dem Doppelmantel des Fermenters verbunden und der Reaktor thermostatisiert. Nach Aktivierung der Datenerfassung und der pH-Wert-Regelung war der Fermenter einsatzbereit.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Aufnahme der Wachstumskurve

Zur Untersuchung der Wachstumsparameter von *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 wurde ein Schüttelkolben mit 50 ml MinS<sup>9</sup>N<sup>0,5</sup>PG<sup>25</sup> Medium mit 1 ml Zellsuspension angeimpft und im Inkubator der Anaerobierbank bei 35 °C inkubiert. In Abständen wurde eine Probe gezogen, deren OD (siehe 4.5) und Zellzahl (siehe 4.4) bestimmt wurden. Die Untersuchung der Wachstumsparameter von IK 123 wurde in Vials im Wasserbad (GFL, Burgwedel) bei 32 °C analog zu der von *C. butyricum* NRRL B-1024 durchgeführt.

### 5.2 Untersuchungen zur Abhängigkeit der Überlebensrate bei der Immobilisierung vom Alter der Clostridienkultur

Zur Untersuchung der Abhängigkeit der Überlebensrate vom Kulturalter wurden 100 ml MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>PG<sup>25</sup> mit 25 µl einer aktiven Vorkultur (*Clostridium butyricum* NRRL B-1024; Alter ca. 16 Stunden) angeimpft und bei 32 °C inkubiert. In Zeitintervallen wurde eine Immobilisierung mit ungefähr  $1 \cdot 10^6$  Zellen pro 100 g LentiKat<sup>®</sup>Liquid durchgeführt (siehe 4.2.3). Die Zellzahl wurde dabei über die Transmission abgeschätzt. Zur genauen Bestimmung der Anzahl der immobilisierten Zellen wurde parallel zur Immobilisierung die Zellzahl der Vorkultur durch Auszählen bestimmt. Nach Anzucht der Immobilisate über 24 h in MinS<sup>66</sup>N<sup>100</sup>PG<sup>25</sup> wurden die Kolonien angefärbt (siehe 4.3.2) und unter der Stereolupe ausgezählt.

### 5.3 Untersuchungen zur Verwendbarkeit unterschiedlicher Rohglycerinwässer

Um die Verwertbarkeit unterschiedlicher Rohglycerinwässer zu testen, wurden die vorhandenen Rohglycerinwässer standardisiert, um die weitere Versuchsdurchführung zu erleichtern. Sie wurden mit destilliertem Wasser auf 20 % Glyceringehalt verdünnt und der pH-Wert auf pH 7,0 eingestellt.

Nach Abfiltrieren wurde die exakte Glycerinkonzentration mittels HPLC bestimmt. Anschließend wurden in der Anaerobierbank für jedes Rohglycerinwasser je zwei Kulturröhrchen (zu 10 ml) mit einem Glyceringehalt von 25 bzw. 50 g/L unter Verwendung von doppelt konzentriertem Basismedium (MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup> ohne Glycerin, doppelt konzentriert siehe 4.1.1) und sterilem sauerstofffreiem destilliertem Wasser hergestellt. Die Kulturröhrchen wurden mit 0,25 ml einer 24 Stunden alten Kultur von *Clostridium butyricum* NRRL-1024 angeimpft. Zum Zeitpunkt  $t = 0, 22, 44$  und  $120$  h wurde eine Probe genommen und diese mittels HPLC analysiert. Parallel dazu wurden die Rohglycerinwässer chemisch charakterisiert.

Die Bezeichnungen der Rohglycerinwässer setzen sich dabei nach dem folgenden Schema zusammen: Der erste Buchstabe steht für die Herkunft der Proben, der zweite Buchstabe erläutert den Prozess (F: Fettspaltung, S: Fettverseifung, D: Biodieselproduktion) bei dem das Rohglycerinwasser anfällt und die Zahl steht für die Probennummer. Die Herkunft der untersuchten Proben ist in Tabelle 5-1 aufgeführt, hier finden sich auch Angaben zur Probenahmestelle im Prozess und dem verwendeten Ausgangsstoffen.

**Tabelle 5-1:** Übersicht über die getesteten Rohglycerinwässer

Herkunft	Bezeichnung	Probenstelle	Anlagentyp	Ausgangsstoff
Spaltung	AF1	vor Aufbereitung		nicht angegeben
	BF1	nach Spaltturm		Kokosöl
	BF2	nach Voreind. u. Reinig.		
	CF1	nach Spaltturm		Rapsöl
	CF2	nach Reinig. u. Eindampf.		
	CF3	nach Spaltturm		Kokosöl
	CF4	vor Eindampfung		
Verseifung	AS1	Unterlauge		Kokosöl, Tierfett, Palmfett
	AS2	nach Vorkonzentration		
	BS1	Unterlauge		Tierfett
	BS0	nach Reinig. u. Eindampf.		
Umesterung	AD1	nach Absetzen	Vogel+Noot	Rapsöl
	BD1	nach RME-Abscheidung	Feld+Hahn	Rapsöl
	CD1	Eintritt Aufbereitung	CD-Prozess	Rapsöl
	DD1	Eintritt Aufbereitung	Vogel+Noot	Rapsöl
	DD2	nach Dekantierung		
	DD3	nach Reinig. u. Eindampf.		
	ED1	vor Konzentration	nicht zugeordnet	Rapsöl
	ED2	nach Konzentration		
	ED3	Absatz aus RME-Tank		
	AA1	Eintritt Aufbereitung	Vogel+Noot	Altfett

Tabelle 5-2 gibt Auskunft über die in den Anlagen verwendeten Prozesschemikalien, um zu zeigen, welche Bandbreite an Chemikalien bei der Untersuchung zur Eignung der Rohglycerinwässer für die Biokonversion zu berücksichtigen ist.

**Tabelle 5-2:** Übersicht über die beim Prozess verwendeten Chemikalien

Probe	Prozess-Chemikalien										
	Schwefelsäure	Salzsäure	Essigsäure	Natronlauge	Kalilauge	Ca-Hydroxyd	Na-Chlorid	Fe(III)-Chlorid	Na-Methylat	Al-Sulfat	Methanol
AD1											
BD1											
CD1											
DD1											
DD2											
DD3											
ED1											
ED2											
ED3											
AA1											
AF1											
BF1											
BF2											
CF1											
CF2											
CF3											
CF4											
AS1											
AS2											
BS1											
BS0											

#### 5.4 Untersuchungen zum Einfluss einiger Spurenelemente auf Zellwachstum, Ausbeute und Produktivität von IK 123

Zur Bestimmung des Einflusses der Spurenelemente Eisen, Magnesium, Mangan, Kupfer und Kobalt wurde Mineralsalzmedium (MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>PG<sup>50</sup> pH 7,5) mit unterschiedlichem Gehalt an diesen Spurenelementen (siehe Tabelle 5-3) hergestellt



und je drei 50 ml Vials mit je 40 ml Medium befüllt. Diese Vials wurden mit je 1 ml einer 14 Stunden alten Vorkultur angeimpft und bei 32 °C im Wasserbad inkubiert. Es wurden regelmäßig Proben genommen, die OD bestimmt und die Proben mittels HPLC analysiert.

**Tabelle 5-3:** Untersuchte Konzentrationen der einzelnen Spurenelemente

Fe <sup>2+</sup> [mg/L]	Mg <sup>2+</sup> [mg/L]	Mn <sup>2+</sup> [mg/L]	Cu <sup>2+</sup> [mg/L]	Co <sup>2+</sup> [mg/L]
0,476	0	0,278	0,095	1,700
2,486	13,380	0,556	0,213	2,072
13,539	26,760	0,833	0,355	2,542
20,572	53,520	1,389		3,385
41,674	109,269	2,500		

## 5.5 Untersuchungen zur Hemmung durch Substrat und Produkte

### 5.5.1 Hemmung durch das Substrat Glycerin

Zur Bestimmung der Hemmwirkung des Substrats Glycerin wurde Mineralsalzmedium (MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>PG pH 7,5) mit unterschiedlichem Gehalt an Glycerin (siehe Tabelle 5-4) hergestellt und nach Animpfen (IK 123, Kulturalter ca. 16 h) im Wasserbad bei 32 °C inkubiert. Es wurden regelmäßig Proben genommen, die OD bestimmt, und die Proben mittels HPLC analysiert.

### 5.5.2 Hemmung durch die Produkte

Die Hemmwirkung der Produkte wurde mit Mineralsalzmedium (MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>PG<sup>50</sup> pH 7,5) mit unterschiedlichem Gehalt an diesen Produkten (Tabelle 5-4) getestet. Die OD wurde über den Verlauf der Inkubation gemessen und die Proben mittels HPLC analysiert.

**Tabelle 5-4:** Konzentrationen des Substrats und der Produkte bei den Versuchen zur Untersuchung der Hemmwirkung

Glycerin [g/L]	1,3-Propandiol [g/L]	Acetat 1 [g/L]	Acetat 2 [g/L]	Butyrat [g/L]
49,8	0,4	0,1	0,1	0,0
113,0	50,4	4,7	20,8	10,1
150,8	74,7	8,9	30,4	20,4
197,5	97,1	12,9	40,8	29,5
245,7	144,6	17,7	50,8	38,6
		21,9		

## 5.6 Substratlimitierung

Zur Bestimmung der idealen Glycerinkonzentration wurde Mineralsalzmedium (MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>PG pH 7,5) mit unterschiedlichem Gehalt an Glycerin (10, 20, 30, 40 und 50 g · L<sup>-1</sup>) hergestellt und nach Animpfen mit einer aktiven Kultur (Kulturalter ca. 16 h) von IK 123 im Wasserbad bei 32 °C inkubiert. Es wurden regelmäßig Proben genommen, die OD bestimmt und die Proben mittels HPLC analysiert.

## 5.7 Verwendung von Co-Substraten

Zur Bestimmung der Auswirkungen, die durch die Verwendung von Co-Substraten auf die 1,3-Propandiolbildung entstehen, wurde Mineralsalzmedium (MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>PG<sup>25</sup> pH 7,5) mit unterschiedlichen Gehalten an Molkepermeat hergestellt und je Konzentration zwei Vials nach Animpfen mit IK 123 (Vorkulturalter 24 h) im Wasserbad inkubiert. Es wurden regelmäßig Proben genommen und diese mittels HPLC analysiert.

## 5.8 Adaption von *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 an höhere 1,3-Propandiolkonzentrationen

Um mit dem Stamm *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 eine höhere 1,3-Propandiolendkonzentration zu erreichen, wurde versucht, durch eine langsame Gewöhnung die Toleranz der Mikroorganismen bezüglich 1,3-Propandiol zu steigern. Dazu wurde parallel zur Stammhaltung eine Kultivierung auf mit 1,3-Propandiol angereichertem Mineralsalzmedium durchgeführt. Die Konzentration an 1,3-Propandiol wurde dabei schrittweise über Monate erhöht, bis es gelang, eine Kultur auf Mineralsalzmedium (MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>PG<sup>25</sup>, pH 7,5) mit  $72 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  1,3-Propandiol zum Wachsen zu bringen. Diese adaptierte Kultur wurde anschließend im Fermenter auf verbesserte Eigenschaften überprüft.

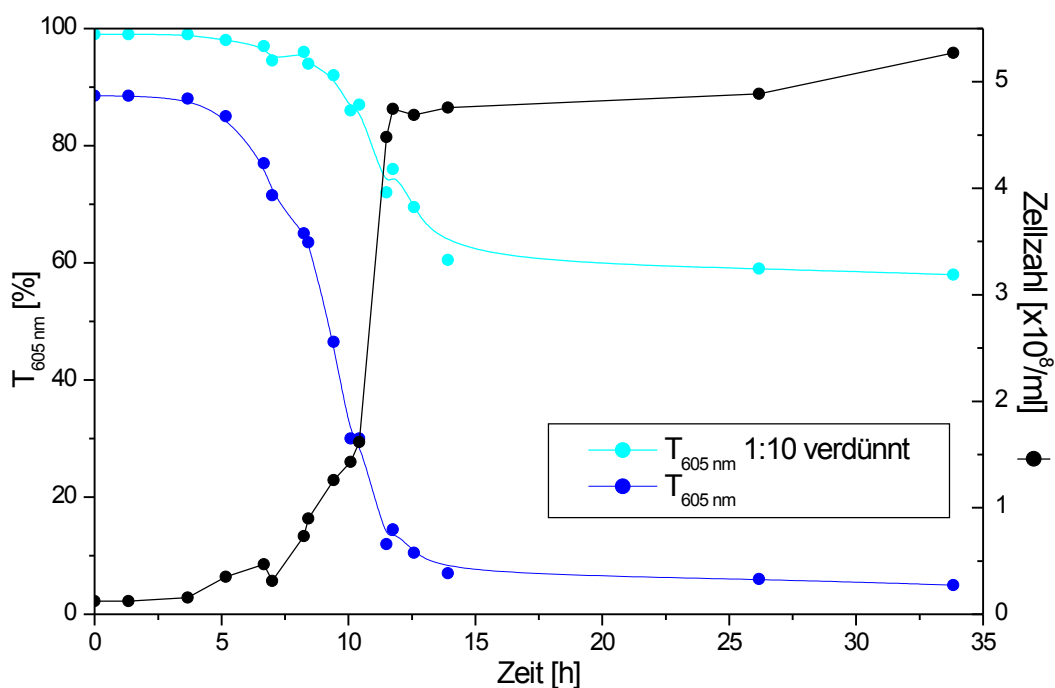


## 6 Ergebnisse und Diskussion

### 6.1 *Clostridium butyricum* NRRL B-1024

#### 6.1.1 Wachstumskurve von *Clostridium butyricum* NRRL B-1024

Das Zellwachstum (siehe 5.1) von *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 folgt dem für Bakterien bei einer Batch-Fermentation typischen Verlauf (Abbildung 6-1). Nach einer lag-Phase (hier ca. 3 h) beginnt die exponentielle Wachstumsphase, die nach 11,5 Stunden durch den Verbrauch des Substrates beendet wird und in die stationäre Phase übergeht.



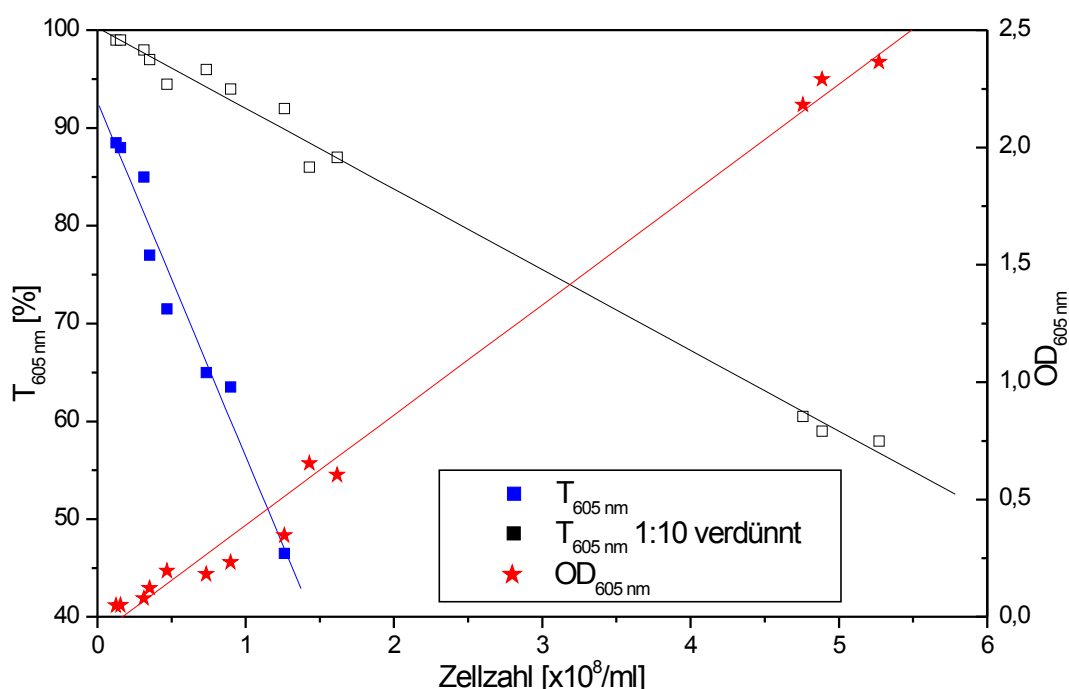
**Abbildung 6-1:** Wachstumskurve von *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 auf  $\text{MinS}^{66}\text{N}^{10}\text{PG}^{25}$  Medium (Schüttelkolben, 35 °C, pH 7,50)

Da es sich bei *Clostridium butyricum* um einen Endosporenbildner handelt, beginnt mit dem Ende der Wachstumsphase die Bildung von Sporen, wodurch das Plateau der Zellzahl in der Zeit zwischen 12 und 35 Stunden entsteht. Ein Absterben der Zellen ist unter den gewählten Versuchsbedingungen erst nach über 40 Stunden erkennbar.

Zwischen OD / Transmission und der Zellzahl lässt sich ein linearer Zusammenhang herstellen (Tabelle 6-1, Abbildung 6-2), der sich zur schnellen Abschätzung der Zellzahl eignet. Im Falle von *Clostridium butyricum* ergibt sich:

**Tabelle 6-1:** Mathematischer Zusammenhang zwischen OD / Transmission und Zellzahl

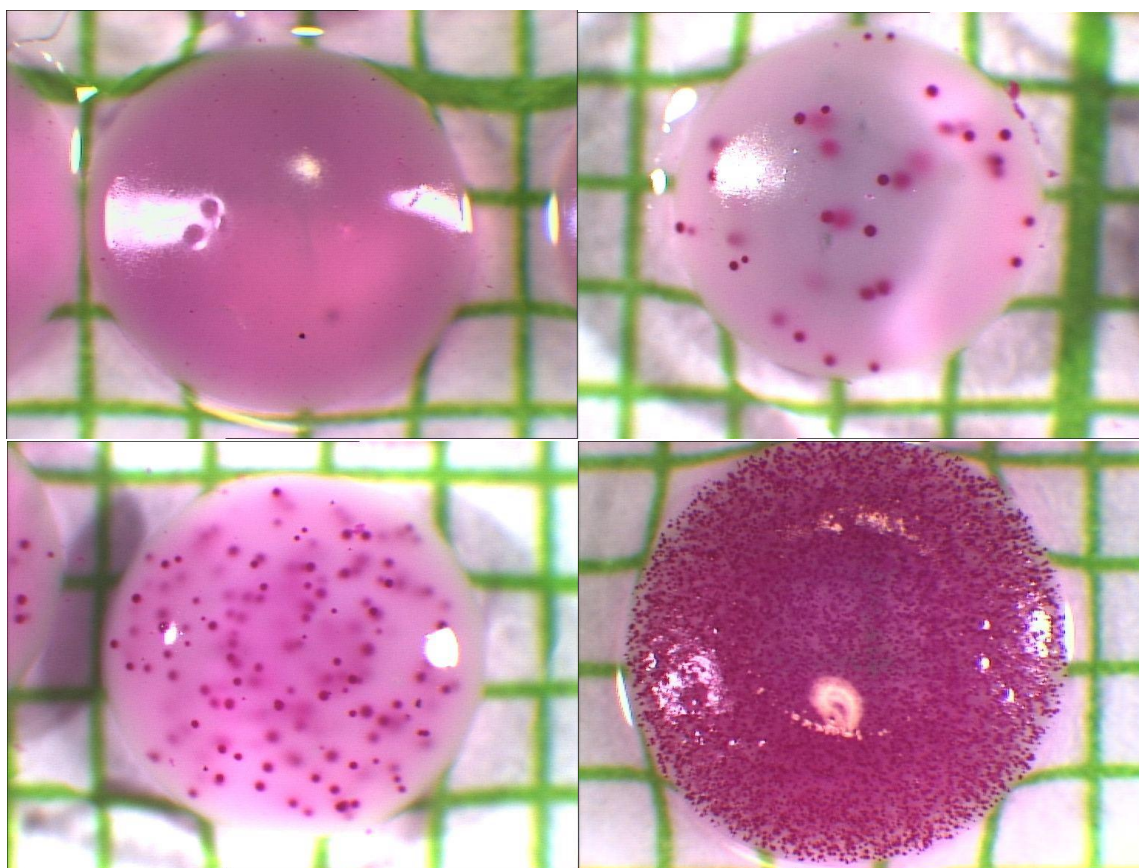
Messgröße	Formel
$T_{605 \text{ nm}}$ unverdünnt	$\text{Zellzahl} = -2,671 \cdot 10^6 \cdot T_{605 \text{ nm}} + 2,491 \cdot 10^8$
$T_{605 \text{ nm}}$ 1:10 verdünnt	$\text{Zellzahl} = -1,204 \cdot 10^7 \cdot T_{605 \text{ nm}} + 1,208 \cdot 10^9$
$OD_{605 \text{ nm}}$	$\text{Zellzahl} = 2,112 \cdot 10^8 \cdot OD_{605 \text{ nm}} + 1,808 \cdot 10^7$



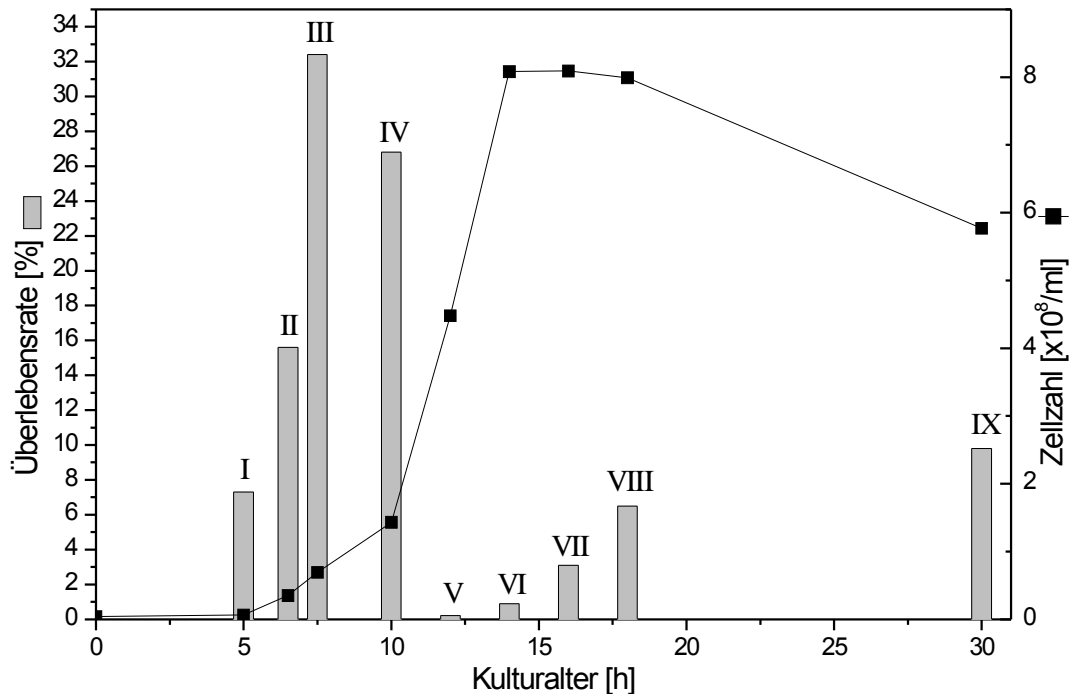
**Abbildung 6-2:** Linearer Zusammenhang zwischen Transmission / OD bei 605 nm und der Zellzahl bei *Clostridium butyricum* NRRL B-1024

### 6.1.2 Untersuchungen zur Abhängigkeit der Überlebensrate bei der Immobilisierung vom Alter der Clostridienkultur

Die Überlebensrate bei der Immobilisierung (siehe 4.2 und 5.2) von Clostridien variiert erheblich. So erhält man unter Umständen bei mehrfacher Immobilisierung sehr unterschiedliche Immobilisate (Abbildung 6-3). Die Beladung der LentiKats<sup>®</sup> kann dabei stark schwanken: Es gibt Exemplare nahezu frei von Kolonien (Abbildung 6-3 oben links) bis zu ideal mit Kolonien beladenen LentiKats<sup>®</sup> (Abbildung 6-3 unten rechts). Um dies näher zu untersuchen, wurde versucht, einen Zusammenhang zwischen Wachstumsphase und Überlebensrate bei der Immobilisierung zu finden. Dazu wurden bei unterschiedlichem Kulturalter schwach beladene LentiKats<sup>®</sup> hergestellt und die Überlebensrate durch Auszählen die Kolonien bestimmt.



**Abbildung 6-3:** Beispiel für LentiKats<sup>®</sup> mit unterschiedlich hoher Überlebensrate nach der Immobilisierung in LentiKat<sup>®</sup>Liquid (siehe 4.2 und 5.2) und Anzucht über 48 h (von links oben nach rechts unten: minimale, schlechte, mittlere und sehr gute Überlebensrate)



**Abbildung 6-4:** Verlauf von Zellzahl und Überlebensrate bei der Immobilisierung über das Alter der Vorkultur von *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 (Schüttelkolben, MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>PG<sup>25</sup>, 35 °C, pH 7,5)

Betrachtet man den Verlauf der Überlebensrate (Abbildung 6-4, Tabelle 6-2) über das Kulturalter (siehe auch 4.1, 4.2, 5.1 und 5.2), so stellt man fest, dass die Überlebensrate erst von 7,5 % auf 32,4 % ansteigt, um dann nach einem rapiden Abfall auf 0,2 % wieder langsam auf einen Wert von 9,8 % anzusteigen. Korreliert man die Veränderungen der Überlebensrate mit der Wachstumskurve, so zeigt sich, dass die Überlebensrate zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase zunimmt, um am Ende der exponentiellen Phase fast auf Null abzusinken. Im Verlauf der Absterbephase steigt die Überlebensrate wieder an. Eine Erklärung für diesen Verlauf der Überlebensrate ergibt sich aus der Sauerstoffempfindlichkeit der Mikroorganismen und dem bei der Trocknung der LentiKats<sup>®</sup> auftretenden hohen osmotischen Druck. Es müssen dabei zwei unterschiedliche Effekte betrachtet werden. Zu Beginn des exponentiellen Wachstums besitzen die Zellen eine hohe Sauerstofftoleranz, die sie zum Ende der exponentiellen Phase wieder verlieren. Auch fällt es sehr vitalen Zellen deutlich leichter, mit den osmotischen Anforderungen umzugehen. Nach dem Ende der exponentiellen Wachstumsphase beginnt die Sporenbildung der Mikroorganismen; diese Sporen sind extrem unempfindlich



gegenüber allen äußeren Einflüssen. Der Kontakt mit Sauerstoff und der erhöhte osmotische Druck während der Immobilisierung haben keinen Einfluss auf die spätere Auskeimrate. Die Überlebensrate im späteren Verlauf des Kulturalters geht wahrscheinlich nur auf das Vorhandensein von Sporen zurück, die nach der Immobilisierung auskeimen und im LentiKat® zur Koloniebildung führen. Betrachtet man diesen Verlauf der Überlebensrate, so ergibt sich für die Immobilisierung, dass nur zwei Zeitpunkte im Verlauf der Zellanzucht über eine hohe Überlebensrate verfügen. Der erste Zeitpunkt liegt am Beginn der exponentiellen Wachstumsphase, der zweite im Verlauf der Absterbephase. Diese beiden Zeitpunkte sind sehr unterschiedlich geeignet, vor allem die Immobilisierung von Zellen am Anfang ihres exponentiellen Wachstums unterliegt einigen Schwierigkeiten.

**Tabelle 6-2:** Ergebnisse zur Abhängigkeit der Überlebensrate vom Kulturalter

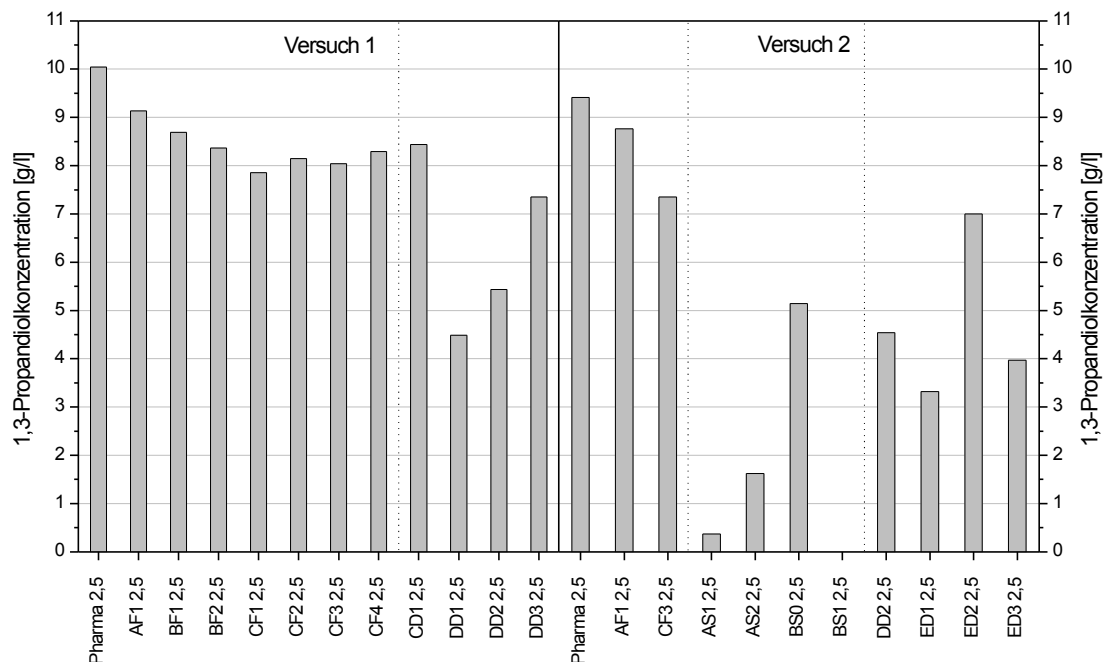
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Kulturalter [h]	5,0	6,5	7,5	10,0	12,0	14,0	16,0	18,0	30,0
T [%]	86	79	67,5	30	12	8	5	5	5
T <sub>1:10</sub> [%]	98	97	96	86	72	61	54	52	58
Zellzahl pro ml	$0,64 \cdot 10^7$	$3,50 \cdot 10^7$	$6,91 \cdot 10^7$	$1,43 \cdot 10^8$	$4,48 \cdot 10^8$	$8,08 \cdot 10^8$	$8,09 \cdot 10^8$	$7,99 \cdot 10^8$	$5,77 \cdot 10^8$
V <sub>Zugabe</sub> [μl]	700	500	250	69,9	22,3	12,4	12,4	12,5	17,3
Masse pro Platte [g]	1,89	1,74	1,88	1,83	1,77	1,82	1,74	1,84	1,80
Zellen pro LentiKat®	206,7	741,9	792,1	445,1	431,7	442,7	424,4	448,8	439,0
Kolonien pro LentiKat®	15,1	115,5	256,5	119,40	0,81	3,81	13,25	29,31	43,13
Überlebensrate [%]	7,3	15,6	32,4	26,8	0,2	0,9	3,1	6,5	9,8

Wird zu spät immobilisiert, so kommt die geringe Überlebensrate zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase zum Tragen, immobilisiert man zu früh, so ist noch keine ausreichende Zellzahl vorhanden. Berechnet man die Zahl der effektiv überlebenden Zellen pro Milliliter Zellkultur und vergleicht diese für die Zeitpunkte IV und VI mit einander (Tabelle 6-2), so steigt die Zellzahl pro Milliliter der Zellkultur zwar von  $1,43 \cdot 10^8$  auf  $8,08 \cdot 10^8$ , also um das 5,5fache, aber die Zahl der effektiv überlebenden Zellen pro Milliliter Zellkultur geht von  $3,83 \cdot 10^7$  auf  $7,27 \cdot 10^6$  zurück, also auf ein Fünftel. Ein etwas verspätetes Immobilisieren führt also zu einem

deutlich verschlechterten Ergebnis. Wartet man hingegen bis die Kultur in die Absterbephase eingetreten ist, so kann man durch die Sporenbildung relativ zeitunkritisch eine hohe Zahl von Kolonien erhalten. Beim Experiment zum Zeitpunkt IX ließen sich Zahlen von  $5,65 \cdot 10^7$  überlebenden Zellen pro Milliliter Zellkultur realisieren. Dies ist mehr als zum Zeitpunkt der höchsten Überlebensrate.

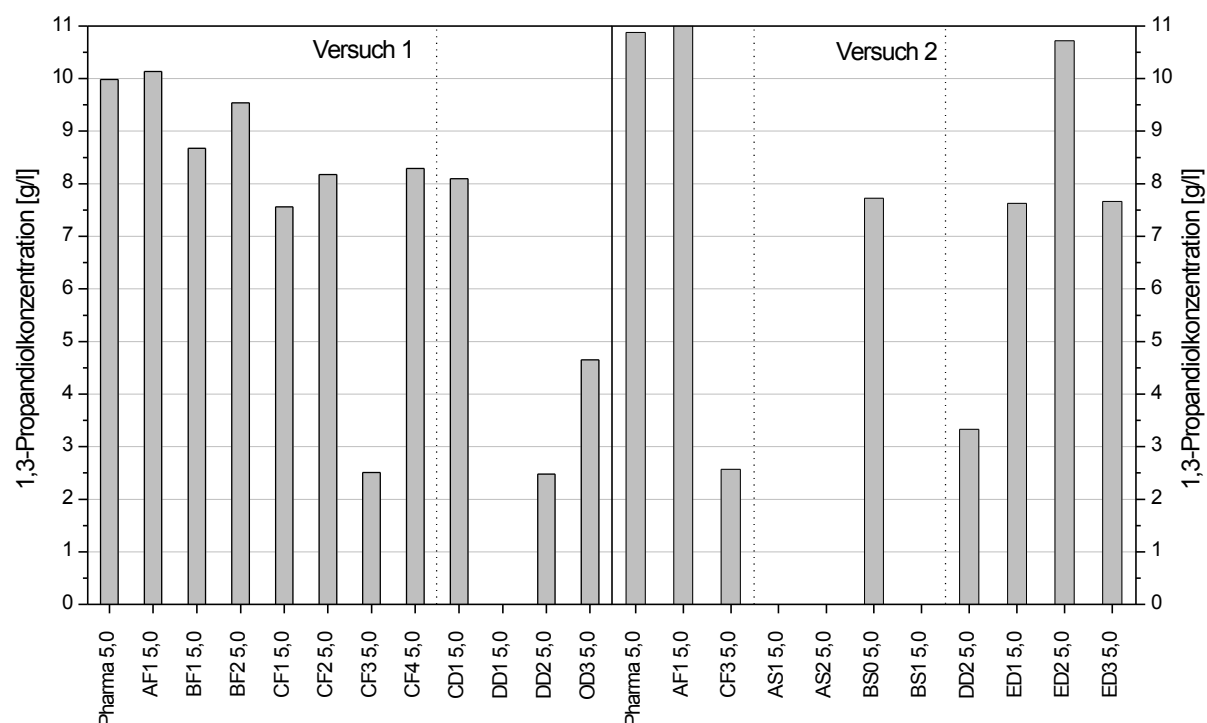
### 6.1.3 Verwertbarkeit unterschiedlicher Rohglycerinwässer

Unter Berücksichtigung der verschiedenen chemischen Grundverfahren (Spaltung (3.2.2.2), Umesterung (3.2.2.3), Verseifung (3.2.2.1)), Details der Anlagen und der verwendeten Rohstoffe (unterschiedliche Pflanzenöle mit unterschiedlichen Fettsäuremustern) wurden verschiedene Rohglycerinwässer auf ihre Verwertbarkeit zur Biokonversion untersucht. Die Eignung dieser Rohglycerine für den Einsatz bei der mikrobiellen Umsetzung zu 1,3-Propandiol wurde mit dem Stamm *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 durchgeführt. Durch paralleles Mitführen eines Referenzansatzes mit Glycerin in Pharmaqualität wurden dabei nicht durch das Rohglycerin bedingte Schwankungen der Wachstumsaktivität ausgeschlossen. Es wurden Glycerinkonzentrationen von 25 und 50 g/L getestet (Abbildung 6-5 und Abbildung 6-6), die in Verbindung mit den Ergebnissen der chemischen Analyse der Inhaltsstoffe (Tabelle 9-1) eine Aussage über die hemmende Wirkung einzelner Inhaltsstoffe erlaubten. Analysiert wurden Glycerin-, Seifen- und Aschegehalt, die Säurezahl und der Gehalt an Blei, Chrom, Kobalt, Eisen, Kalium, Kupfer, Natrium, Nickel, Mangan, Essigsäure und Methanol. Aus versuchstechnischen Gründen war eine Aufteilung der Proben auf zwei Versuche notwendig. Um eine sichere Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden im zweiten Ansatz die Proben AF1, CF3 und DD2 erneut mitgeführt. Die Rohglycerinwässer AD1, BD1 und AA1 konnten nicht getestet werden, da sich schon beim Einstellen des pH-Wertes auf 7,0 die Konsistenz dieser Proben von flüssig nach fest wandelte, und so kein nutzbares Glycerinwasser mehr vorlag. Dies lag am hohen Seifengehalt (Tabelle 9-1) dieser Testchargen.



**Abbildung 6-5:** Gebildete 1,3-Propandiolmenge nach 44 h in Abhängigkeit vom verwendeten Rohglycerinwasser bei einer Ausgangskonzentration von 25 g/L Glycerin (Schüttelkolben, *C. b.* NRRL B-1024, 35 °C, pH 7,50, MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>RG<sup>25</sup>)

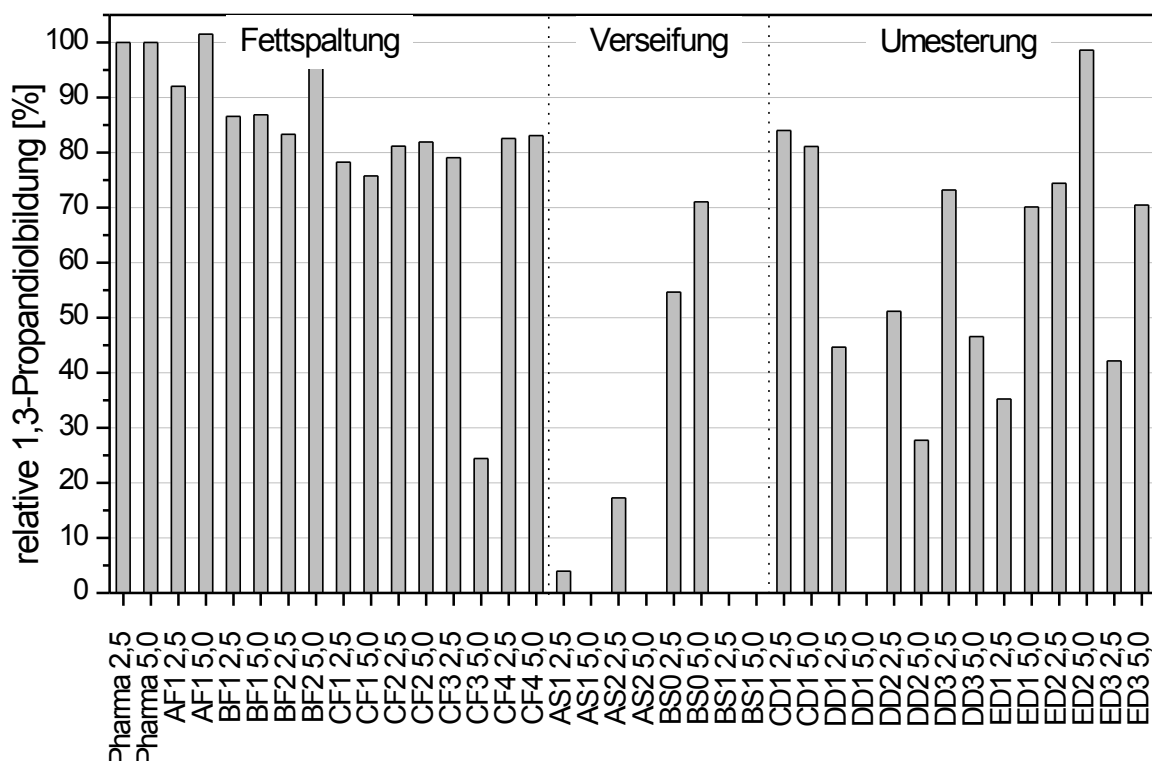
Betrachtet man die auf die relative 1,3-Propandiolbildung bezogenen Ergebnisse (Abbildung 6-7) im Hinblick auf die Herkunft der getesteten Rohglycerinwässer, so zeigt sich, dass die untersuchten Rohglycerinwässer aus Fettspaltungsprozessen mit einer Ausnahme (CF3) sehr gut geeignet sind. Die Rohglycerinwässer aus Verseifungsprozessen sind, wenn man die Ergebnisse der Biokonversionsexperimente (Abbildung 6-7) zugrunde legt, ohne Aufreinigung ungeeignet. Bei der getesteten Charge BS0 handelt es sich um ein aufgereinigtes und aufkonzentriertes Rohglycerinwasser: Die Ergebnisse für BS0 zeigen, dass durch eine Aufreinigung die Verwendung von Verseifungsglycerinwässern möglich wird. Ursächlich dafür sind die hohen Salzgehalte dieser unaufgereinigten Rohglycerinwässer. Die Verwendbarkeit von Glycerinwässern aus Umesterungsanlagen (Produktion von Pflanzenölmethylestern / Biodiesel) hängt vom verwendeten Prozess ab. Das Rohglycerinwasser (CD1) aus einer CD-Prozess Anlage war sehr gut verwendbar. Die Anlagen der Vogel+Noot, bzw. Feld+Hahn Verfahren liefern ein stark seifenhaltiges Rohglycerinwasser. Die nicht testbaren Chargen AD1, BD1 und AA1 gehörten zu den mit diesen Verfahren produzierten Rohglycerinwässern.



**Abbildung 6-6:** Gebildete 1,3-Propandiolmenge nach 44 h in Abhängigkeit vom verwendeten Rohglycerinwasser bei einer Ausgangskonzentration von 50 g/L Glycerin (Schüttelkolben, *Clostridium butyricum* NRRL B-1024, 35 °C, pH 7,50, MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>RG<sup>50</sup>)

Dass die Seifenkonzentration einen entscheidenden Einfluss auf die Nutzbarkeit des Rohglycerinwassers hat, zeigt sich in den Ergebnissen mit den Rohglycerinwässern der Gruppe DD. Die nach 44 h erreichte 1,3-Propandiolkonzentration (Abbildung 6-5) steigt mit abnehmendem Seifenanteil an. Ein weiteres Problem bei der Verwendung von Rohglycerinwässern aus Umesterungsanlagen stellt das als Prozesschemikalie in diesen Anlagen verwendete Methanol dar. Es lässt sich auch in den Rohglycerinwässern finden und wirkt im Versuch wachstumshemmend. Eine weitere Korrelation der 1,3-Propandiolbildung (Abbildung 6-7) mit den Analysenergebnissen der eingesetzten Rohglycerinwässer (Tabelle 9-1) liefert im Bezug auf die untersuchten Kationen keine über die bisher diskutierten Ergebnisse hinaus gehenden weiteren Erkenntnisse. Das Vorhandensein von Blei zeigt in den vorkommenden Konzentrationen keinen negativen Einfluss. Dies gilt analog für das Vorkommen von Kupfer, Nickel, Mangan, Eisen, Kobalt und Chrom. Lediglich die teilweise sehr hohen Natrium- und Kaliumkonzentrationen wirken sich negativ auf

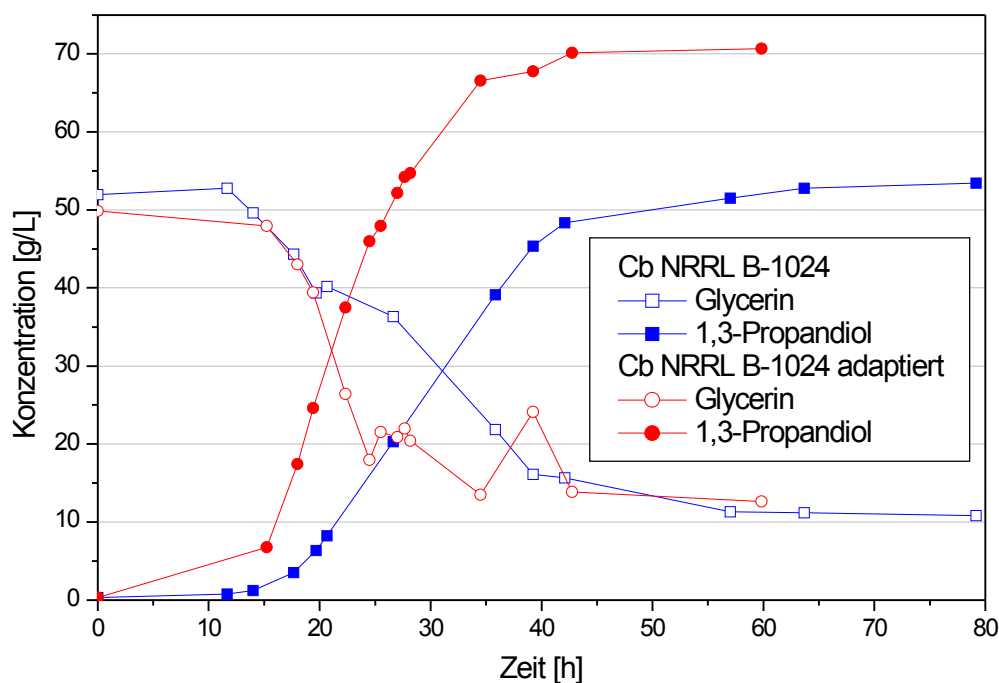
das Zellwachstum und damit auf die 1,3-Propandiolbildung aus. Die Ursache für die bei der Verwendung von AF1 in höheren Konzentrationen auftretende Steigerung der 1,3-Propandiolbildung auf über 100 % (Abbildung 6-7) konnte leider nicht ermittelt werden, da die Analyseergebnisse (Tabelle 9-1) keinen Hinweis lieferten. Es kann aber vermutet werden, dass die im Rohglycerinwasser enthaltenen nicht erfassten organischen Bestandteile hierfür mit verantwortlich sind.



**Abbildung 6-7:** Relative 1,3-Propandiolbildung in Abhängigkeit vom verwendeten Rohglycerinwasser bezogen auf die Menge des bei der Verwendung von Pharmaglycerin gebildeten 1,3-Propandiols (Schüttelkolben, *Clostridium butyricum* NRRL B-1024, 35 °C, pH 7,50, MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>RG<sup>25</sup> / MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>RG<sup>50</sup>)

### 6.1.4 Adaption von *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 an höhere 1,3-Propandiolkonzentrationen

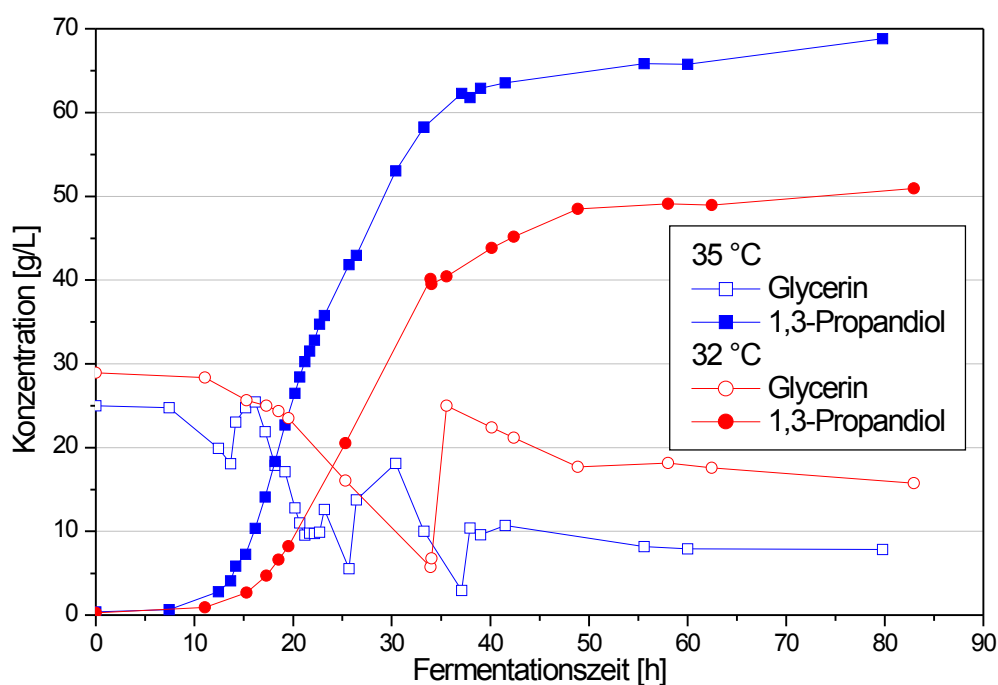
Zur Erhöhung der Endkonzentration an 1,3-Propandiol wurde versucht, durch Adaption des Mikroorganismus (siehe 5.8) eine höhere Produkttoleranz zu erreichen. Nachdem es gelungen war die Toleranz so weit zu steigern, dass ein Zellwachstum auf Medium mit  $72 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  1,3-Propandiol erfolgte, wurde diese Kultur in einer fed-batch-Fermentation getestet. Als Feed diente 80 %iges (w/w) Glycerin mit einem Hefeextraktgehalt von  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Abbildung 6-8 zeigt einen Vergleich dieser Fermentation mit vorangegangenen Fermentationen mit *Clostridium butyricum* NRRL B-1024. Es wird deutlich, dass die Adaption ein Erfolg war. Die erreichte Endkonzentration konnte von  $53,5$  auf  $71,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  gesteigert werden. Die Produktivität verbesserte sich ebenfalls, wodurch sich die Fermentationsdauer reduzierte. Die durchschnittliche Produktivität steigerte sich von  $0,67$  auf  $1,19 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ . Bei der maximalen Produktivität wurde eine Steigerung von  $2,0$  auf  $4,5 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$  erreicht. Eine Auswirkung der Adaption auf die Ausbeute konnte dabei nicht beobachtet werden, die molare Ausbeute blieb unverändert bei  $0,60$ .



**Abbildung 6-8:** Vergleich zweier fed-batch-Fermentationen von adaptiertem und nicht adaptiertem *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 (MinS<sup>10</sup>N<sup>33</sup>PG, 35 °C, pH 7,0, Feed: 80 %iges Pharmaglycerin mit  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Hefeextrakt)

### 6.1.5 Veränderung der Fermentationstemperatur

Es wurde untersucht, ob sich durch Senken der Fermentationstemperatur eine Verbesserung des Fermentationsverlaufes mit dem adaptierten Stamm erreichen lies. Dazu wurde die bereits in Kapitel 6.1.4 dargestellte fed-batch Fermentation bei einer Temperatur von 32 °C unter ansonsten identischen Bedingungen erneut durchgeführt. Ein Vergleich der Fermentationen (Abbildung 6-9) zeigt, dass das Absenken der Fermentationstemperatur um 3 °C kontraproduktiv ist. Nicht nur die Produktivität sinkt, die erreichte Endkonzentration fällt um  $18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  und liegt damit unter den mit dem Ausgangsstamm erzielten Ergebnissen (vergleiche Abbildung 6-8).

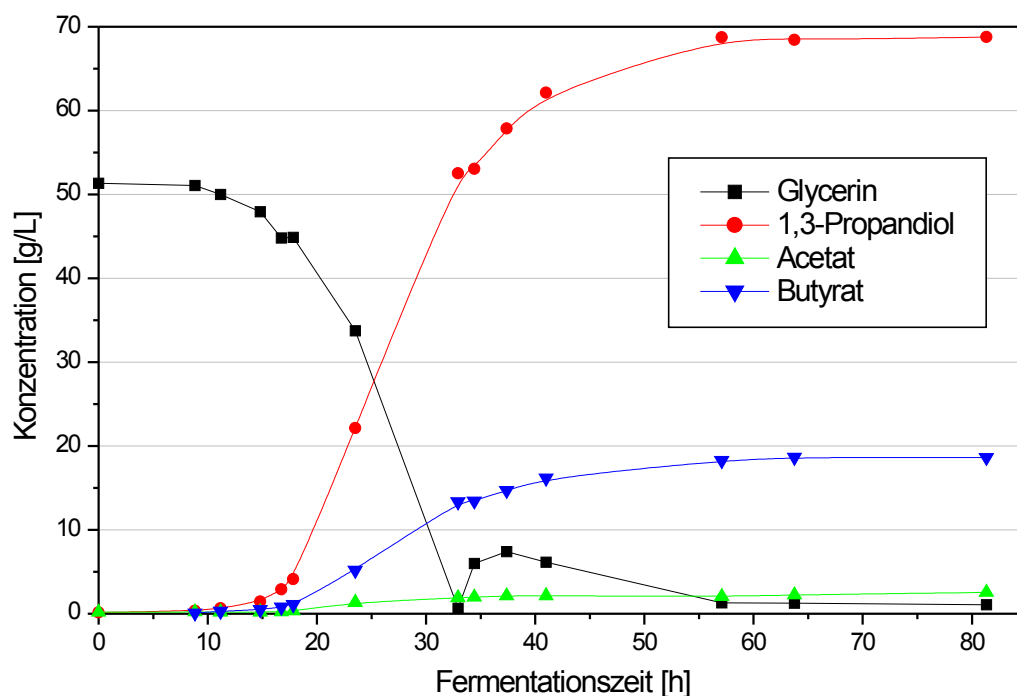


**Abbildung 6-9:** Vergleich der fed-batch-Fermentationen des adaptierten *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 Stammes bei 32 und 35 °C (MinS<sup>10</sup>N<sup>33</sup>PG, pH 7,0, Feed: 80 %iges Pharmaglycerin mit  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Hefeextrakt)

### 6.1.6 Fermentation im 10 Liter Maßstab

Ein Teil dieser Arbeit umfasste auch die Bereitstellung größerer Mengen an Fermenterbrühe, um dem Projektpartner Tests zur Aufarbeitung zu ermöglichen. Dazu wurden Fermentationen im 10 Liter Maßstab (siehe 4.10) durchgeführt. Es wurde dabei unter den für den jeweiligen Mikroorganismus als optimal ermittelten Bedingungen fermentiert.

Bei der 10 Liter Fermentation mit *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 (adaptiert) ergaben sich aus dem Scale-up keine Veränderungen (Abbildung 6-10). Die 1,3-Propandiolendkonzentration lag bei  $68,8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  und molare Ausbeute und Produktivität lagen relativ unverändert bei 0,60 und  $1,2 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ .



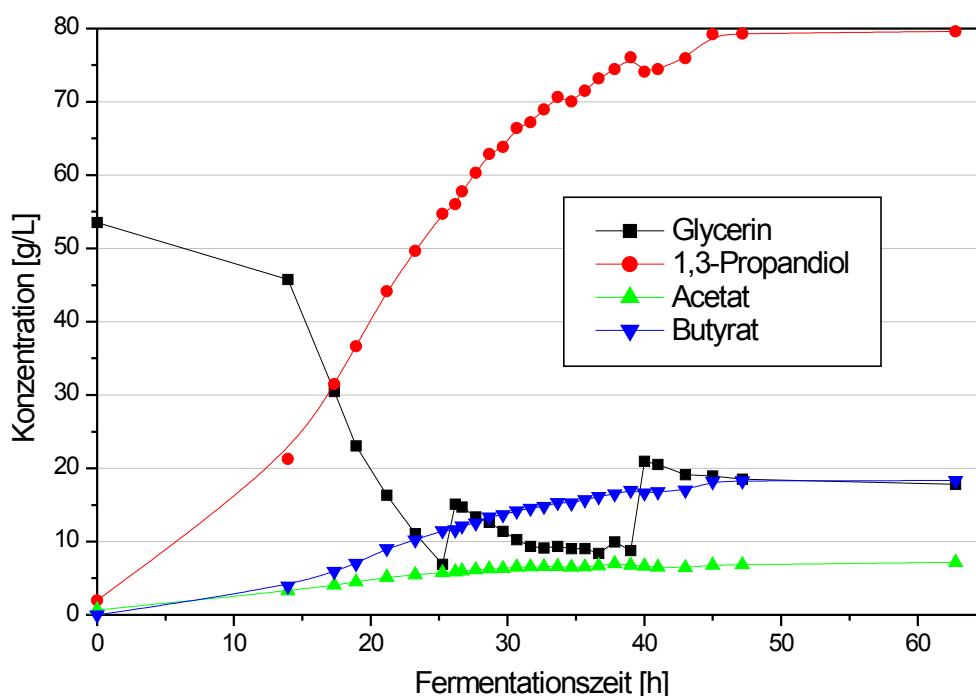
**Abbildung 6-10:** fed-batch-Fermentation mit *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 im 10 Liter Maßstab (MinS<sup>10</sup>N<sup>33</sup>PG, pH 7,0, 35 °C, Feed: 80 %iges Pharmaglycerin mit  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Hefeextrakt)



## 6.2 Biokonversion mit dem Stamm IK 96 / IK 124

### 6.2.1 Testfermentation mit dem Stamm IK 96

In der Zeit, in der die Adaption von *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 erfolgte, und im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde am Institut für Technologie und Biosystemtechnik der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft ein Screening nach produkttoleranteren *Clostridien* durchgeführt. Im Laufe dieses Screenings wurden verschiedene Stämme gefunden, die aus Glycerin 1,3-Propandiol produzieren konnten. Die gefundenen Stämme wurden daraufhin im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Leistungsfähigkeit untersucht. Der erste dieser Stämme (IK 96) wurde zeitlich zum Ende der Adaptionsexperimente isoliert. Er wurde mit den für den adaptierten *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 Stamm optimalen Fermentationsbedingungen (siehe 6.1.4) getestet. Abbildung 6-11 zeigt das Ergebnis. Es wurde im ersten Versuch eine 1,3-Propandiolkonzentration von  $79,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  erreicht. Die molare Ausbeute lag bei 61 %.

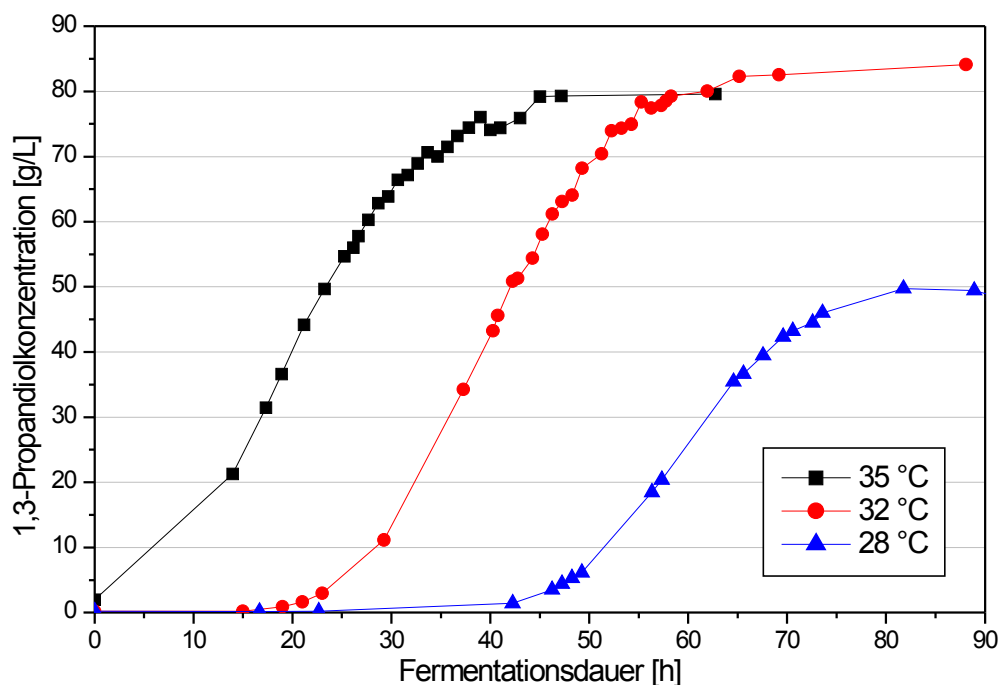


**Abbildung 6-11:** Fed-batch-Fermentation von IK 96 (MinS<sup>10</sup>N<sup>33</sup>PG, 35 °C, pH 7,0, Feed: 80 %iges Pharmaglycerin mit  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Hefeextrakt)

Mit dem Stamm IK 96 wurde schon ohne die geringste Optimierung eine um fast  $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  höhere 1,3-Propandiolkonzentration erreicht als mit dem adaptierten *Clostridium butyricum* NRRL B-1024. Dieses gute Ergebnis führte dazu, dass in den nächsten Experimenten versucht wurde, durch Optimierung der Fermentationsparameter die Fähigkeiten des IK 96-Stammes herauszufinden.

### 6.2.2 Optimierung der Fermentationstemperatur für IK 96

Als erstes wurde die Fermentationstemperatur variiert. Es wurden Fermentationen bei 28 und 32 °C durchgeführt, wobei die anderen Parameter (MinS<sup>10</sup>N<sup>33</sup>PG, pH 7,0, Animpfverhältnis 4 %, Feed: 80 %iges Pharmaglycerin mit  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Hefeextrakt,...) nicht verändert wurden.



**Abbildung 6-12:** Vergleich der Fermentationen von IK 96 bei den Temperaturen 28, 32 und 35 °C (MinS<sup>10</sup>N<sup>33</sup>PG, pH 7,0, Feed: 80 %iges Pharmaglycerin mit  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Hefeextrakt)

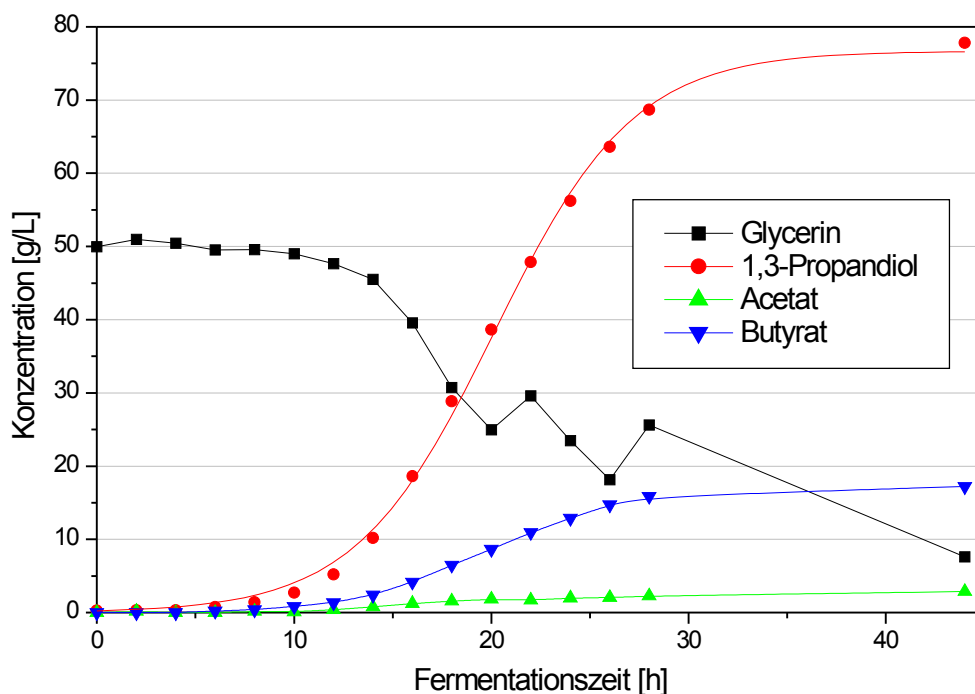
Es zeigte sich (Abbildung 6-12, Tabelle 6-3), dass eine Variation der Temperatur im Bereich von 28 bis 35 °C einen entscheidenden Einfluss auf den Fermentationsverlauf hat. Die erreichte Endkonzentration an 1,3-Propandiol stieg beim Absenken der Temperatur von 35 auf 32 °C auf 84,1 g · L<sup>-1</sup> an, um bei einem weiteren Herabsetzen der Temperatur auf 28 °C auf unter 50 g · L<sup>-1</sup> abzufallen. Des weiteren war eine extreme Verlängerung der lag-Phase bei reduzierten Temperaturen zu beobachten. Während bei 35 °C die lag-Phase noch vernachlässigbar kurz war, stieg sie bei 32 °C schon auf 15 Stunden an. Bei 28 °C betrug die lag-Phase schon über 24 Stunden. Interessant war auch die Auswirkung der Temperaturveränderung auf die molare Ausbeute. Diese stieg beim Absenken der Temperatur an. Bei 32 °C betrug sie schon 62 %, ein Verringern der Temperatur auf 28 °C führt zu einem Anstieg auf 64 % molarer Ausbeute. Die Ursache für diese Verbesserung der Ausbeute war offensichtlich in einem veränderten Stoffwechsel der Zellen zu suchen. So änderte sich das Verhältnis der produzierten Nebenprodukte entscheidend. Bei 35 °C bildete IK 96 noch 2,6 mal soviel Butyrat wie Acetat, während bei 28 °C 2,2 mal mehr Acetat als Butyrat gebildet wurde. Dass dies die Ausbeute an 1,3-Propandiol beeinflusst, ist schon in der Literatur beschrieben (ZENG 1996). Nachdem die Optimierung der Fermentationstemperatur abgeschlossen war, stellte sich in mikrobiologischen Untersuchungen heraus, dass es sich bei IK 96 um eine Mischkultur handelte. Eine Überprüfung des aus dieser Mischkultur isolierte 1,3-Propandiolbildners (IK 124) zeigte, dass sich die mit der Mischkultur erzielten Ergebnisse auf die Reinkultur übertragen lassen. Die weiteren Experimente wurden mit der Reinkultur IK 124 durchgeführt.

**Tabelle 6-3:** Vergleich der fed-batch-Fermentationen von IK 96 bei unterschiedlichen Temperaturen

Temperatur [°C]	28	32	35
erreichte 1,3-Propandiol Endkonzentration [g · L <sup>-1</sup> ]	49,7	84,1	79,6
molare Ausbeute [%]	63,4	62,1	61,0
Produktivität [g · (L · h) <sup>-1</sup> ]	0,61	1,19	1,64

### 6.2.3 Fermentation mit Rohglycerin (IK 124)

Da die Verwendung von Glycerin in Pharmaqualität für einen technischen Prozess aus Kostengründen nicht realisierbar ist, ein Scale-up in den technischen Maßstab aber angestrebt wird, wurde die Verwendung von Rohglycerin bei der Biokonversion mit IK 124 untersucht. Dazu wurde ein Rohglycerinwasser aus einer Fettspaltungsanlage analog zu dem in Kapitel 6.1.3 als CF2 gekennzeichneten Rohglycerinwasser verwendet. Die Fermentation wurde beim in Kapitel 6.2.2 ermittelten Temperaturoptimum durchgeführt. In Abbildung 6-13 ist das Ergebnis dieses Experimentes dargestellt. Es wurde eine 1,3-Propandiolkonzentration von 77,8 g · L<sup>-1</sup> in 44 Stunden erreicht. Die molare Ausbeute lag bei 63 %. Die durchschnittliche Produktivität betrug 1,47 g · (L · h)<sup>-1</sup>. Die Verwendung von Rohglycerin führte zu einer Verringerung der 1,3-Propandiolkonzentration um 7,5 %. Die molare Ausbeute stieg bei Verwendung des Rohglycerins um 1 % an. Dies ist erstaunlich, da 6,2 mal mehr Butyrat als Acetat gebildet wurde. Dieses Acetat/Butyrat-Verhältnis ist gegenüber den Versuchen mit Pharmaglycerin deutlich in Richtung Butyrat verschoben, was nach ZENG (1996) eigentlich auf eine schlechte Ausbeute hindeuten sollte. Eine Ursache hierfür ist in den im Rohglycerin enthaltenen Verunreinigungen zu suchen. Da aber eine vollständige Analyse des Rohglycerins insbesondere der organischen Bestandteile fehlt, kann hierüber nur spekuliert werden.

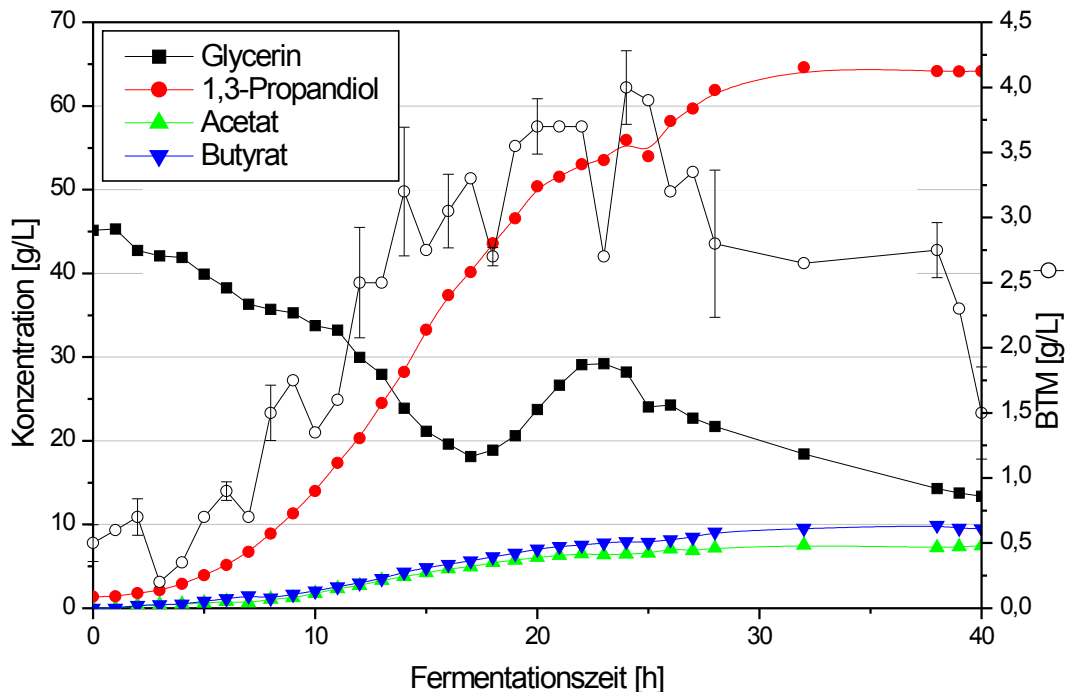


**Abbildung 6-13:** Fed-batch-Fermentation mit IK 124 im 1 Liter Maßstab unter Verwendung von Rohglycerin (MinS<sup>15</sup>N<sup>50</sup>RG, pH 7,0, 32 °C (MinS<sup>10</sup>N<sup>33</sup>PG, 35 °C, pH 7,0, Feed: 80 %iges Rohglycerin mit 40 g · L<sup>-1</sup> Hefeextrakt)

#### 6.2.4 Fermentation im 200 Liter Maßstab

Um dem Projektpartner eine Untersuchung der 1,3-Propandiolaufräumung im Technikumsmaßstab zu ermöglichen, wurde ein Scale-up in den 200 Liter Maßstab vorgenommen. Die Fermentation wurde unter Verwendung von Rohglycerin durchgeführt, da die Auswirkungen der Verwendung von Rohglycerin auf die Aufarbeitung der Fermentationsbrühe durch den Projektpartner berücksichtigt werden sollten. Es handelte sich um ein Rohglycerinwasser aus einer Fettsplaltungsanlage analog zu dem in Kapitel 6.1.3 als CF2 gekennzeichneten Rohglycerinwasser. Als Fermentationstemperatur wurde 35 °C gewählt, um die Fermentationsdauer zu verkürzen. Aufgrund technischer Probleme schwankte die

Temperatur aber zwischen 33 und 35 °C, sodass die mittlere Temperatur bei 34 °C lag.



**Abbildung 6-14:** Fed-batch-Fermentation mit IK 124 im 200 Liter Maßstab (MinS<sup>15</sup>N<sup>50</sup>RG, pH 7,0, 34 °C, Feed: 80 %iges Rohglycerin mit 40 g · L<sup>-1</sup> Hefeextrakt)

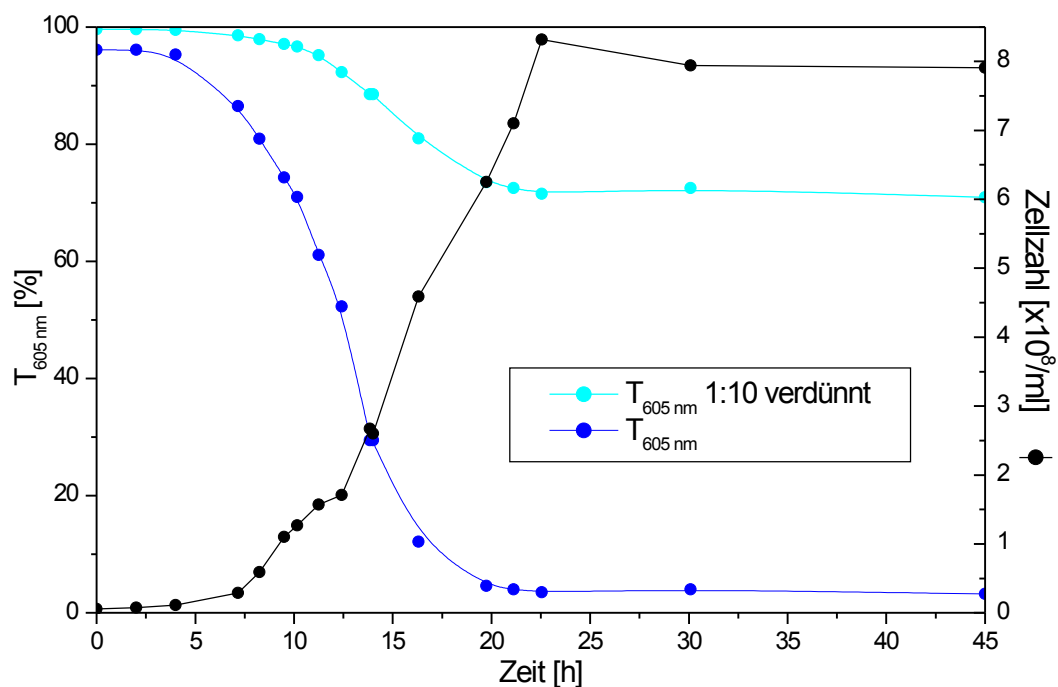
Wie Abbildung 6-14 zeigt, gelang es innerhalb von 40 Stunden eine 1,3-Propanediolkonzentration von 64,6 g · L<sup>-1</sup> zu erreichen. Die durchschnittliche Produktivität betrug 1,70 g · (L · h)<sup>-1</sup>. Eine Ausbeute konnte leider nicht ermittelt werden, da keine Waagen zur Quantifizierung des Feeds und der Natronlaugenzudosage zur pH-Wert-Regelung zur Verfügung standen. Die erreichte Endkonzentration an 1,3-Propanediol lag 13,2 g · L<sup>-1</sup> unter der im 1-Liter-Maßstab erreichten Endkonzentration. Eine Ursache für diese Verschlechterung der Resultate bei der Maßstabsvergrößerung der Fermentation mit IK 124 liegt wahrscheinlich in den deutlichen Unterschieden zwischen den zwei verwendeten Fermentern und dadurch ungewollt unterschiedlichen Versuchsbedingungen. Beim 1 Liter Fermenter handelte es sich um einen Glasfermenter mit einem Magnetrührkern zur Durchmischung (siehe 4.10.1). Beim 400 Liter Fermenter handelte es sich um einen Edelstahlfermenter mit drei Propellerrührern. Diese Unterschiede der Fermenter

sorgten für deutliche Unterschiede bei Durchmischung, auftretenden Scherkräften und dem Gasaustausch. Des weiteren gab es bei der Glycerinzudosage Probleme, die dazu führten, dass die Glycerinkonzentration im Zeitraum von 17 bis 22 Stunden Fermentationsdauer ungeplant von 18 auf  $29 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  anstieg. Diese für den fortgeschrittenen Fermentationsverlauf hohe Glycerinkonzentration hat wahrscheinlich in Verbindung mit dem enthaltenen 1,3-Propandiol das weitere Zellwachstum gehemmt und somit zu einem früheren Fermentationsende führte.

## **6.3 Biokonversionstests mit dem Stamm IK 123**

### **6.3.1 Wachstumskurve von IK 123**

Analog zum Zellwachstum von *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 wurden auch die Wachstumsparameter für den Organismus IK 123 bestimmt (Abbildung 6-15, Tabelle 6-4). Nach einer lag-Phase (hier ca. 3 h) beginnt die exponentielle Wachstumsphase, die nach 20 Stunden durch den Verbrauch des Substrates beendet wird und in die stationäre Phase übergeht. Da es sich auch bei IK 123 um einen Endosporenbildner handelt, beginnt mit dem Ende der Wachstumsphase die Bildung von Sporen, wodurch das Plateau bei der Zellzahl in der Zeit zwischen 20 und 45 Stunden entsteht. Ein Absterben der Zellen ist unter den gewählten Versuchsbedingungen erst nach über 45 Stunden erkennbar.

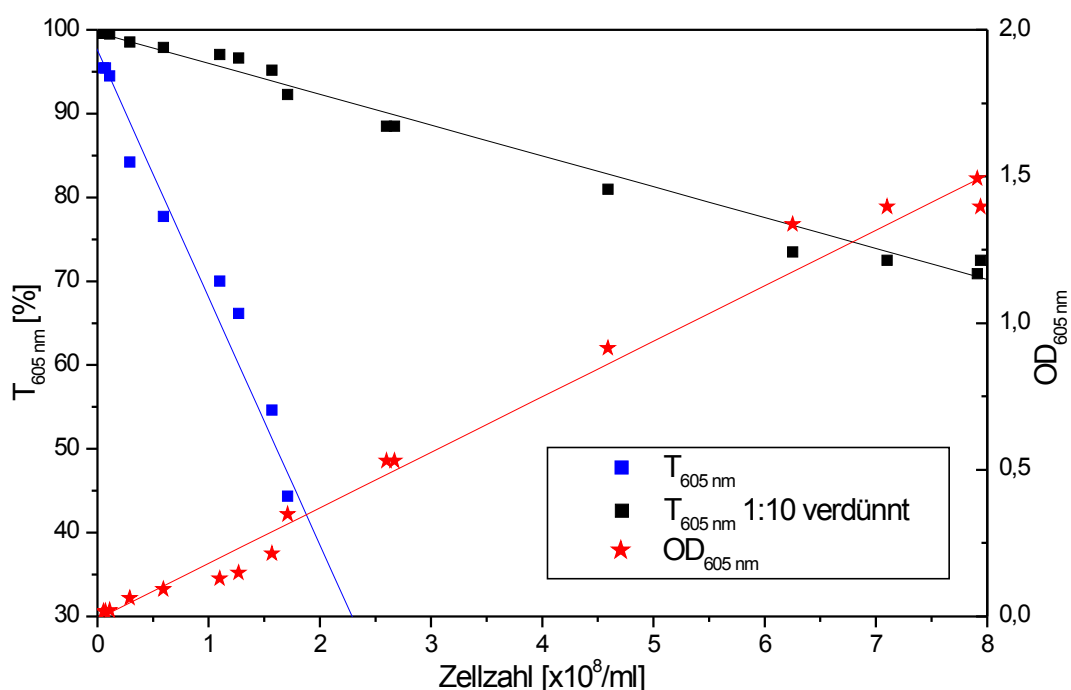


**Abbildung 6-15:** Wachstumskurve von IK 123 auf MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>PG<sup>25</sup> Medium (Vial, 32 °C, pH 7,50)

**Tabelle 6-4:** Zusammenhang zwischen OD / Transmission und Zellzahl

Messgröße	Formel
$T_{605 \text{ nm}}$ unverdünnt	$\text{Zellzahl} = -3,894 \cdot 10^6 \cdot T_{605 \text{ nm}} + 3,830 \cdot 10^8$
$T_{605 \text{ nm}}$ 1: 10 verdünnt	$\text{Zellzahl} = -2,670 \cdot 10^7 \cdot T_{605 \text{ nm}} + 2,667 \cdot 10^9$
$OD_{605 \text{ nm}}$	$\text{Zellzahl} = 5,208 \cdot 10^8 \cdot OD_{605 \text{ nm}} + 8,937 \cdot 10^6$





**Abbildung 6-16:** Linearer Zusammenhang zwischen Transmission / OD bei 605 nm und der Zellzahl bei IK 123

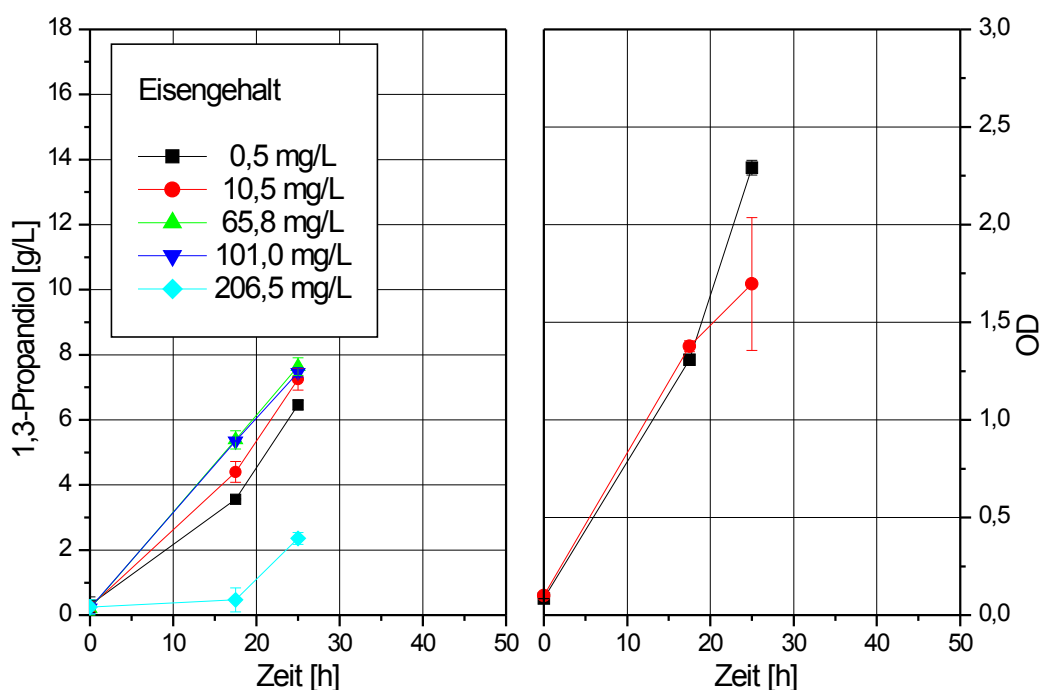
### 6.3.2 Einfluss einiger Spurenelemente auf Zellwachstum, Ausbeute und Produktivität von IK 123

Ziel dieser Experimente war es, Informationen zur Medienoptimierung für die Biokonversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol mit dem Mikroorganismus IK 123 zu gewinnen. In Verbindung mit den Analysenergebnissen der Rohglycerinwässer (Tabelle 9-1) sollte deren Verwendbarkeit geklärt werden.

#### 6.3.2.1 Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ )

Bei der Untersuchung des Einflusses von Eisen kam es bei den höheren  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentrationen zur Bildung von Eisensulfid in den Vials. Dieses machte eine Bestimmung der optischen Dichte unmöglich. Eine Aussage über den Einfluss der

Eisenkonzentration auf das Zellwachstum kann also nicht getroffen werden. Der Einfluss von Eisen kann also nur auf Basis des in Abbildung 6-17 dargestellten Verlaufs der 1,3-Propandiolkonzentration und der anderen in Tabelle 6-5 zusammengestellten Ergebnissen aus den HPLC-Analysen abgeleitet werden. Es ist deutlich zu erkennen, dass eine  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration von über  $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  zu einer extremen Verschlechterung der 1,3-Propandiolbildung führt. Im Konzentrationsbereich bis  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ist eine deutliche Verbesserung bei steigender  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration gegenüber der Konzentration von  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  zu beobachten. Die optimale Ausbeute lag bei einem Eisengehalt von  $10,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , die maximale Produktivität bei  $65,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Betrachtet man unter diesen Gesichtspunkten die Ergebnisse der Rohglycerinwässeranalysen (Tabelle 9-1), so kann man sagen, dass in den untersuchten Rohglycerinwässern keine Eisenkonzentrationen in störenden Größenordnungen vorkommen. Eine Optimierung des Standardmediums ist ebenfalls nicht nötig, da die Standardkonzentration an  $\text{Fe}^{2+}$  sich im optimalen Bereich befindet.

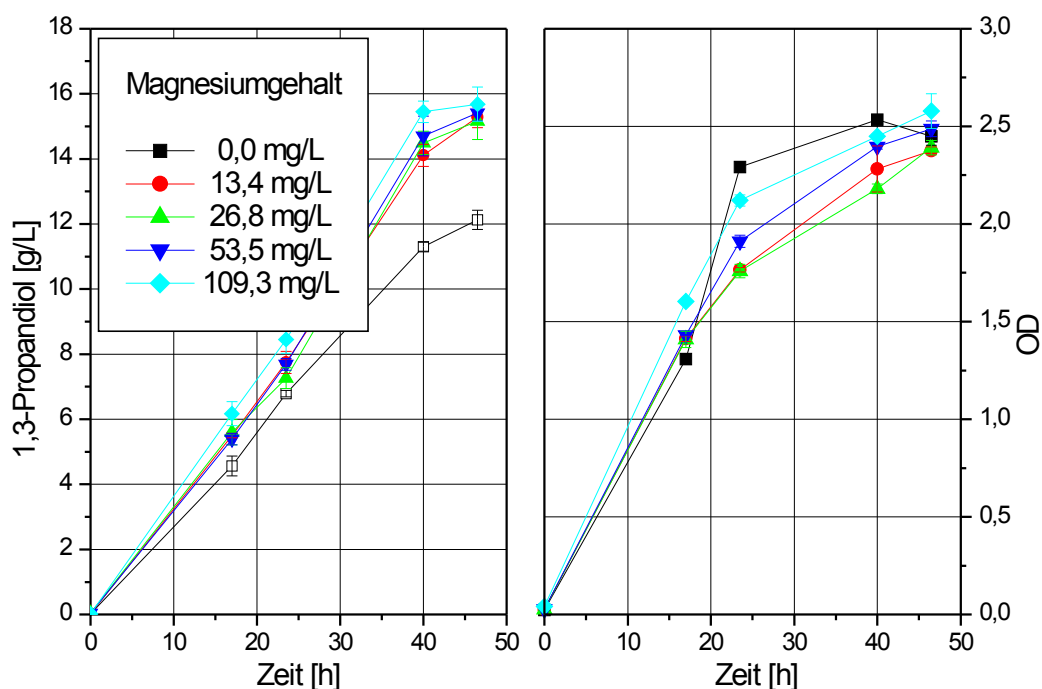


**Abbildung 6-17:** Einfluss der Eisenkonzentration auf 1,3-Propandiolbildung und Zellwachstum (Vial, MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>PG<sup>50</sup>, 32 °C, pH 7,50)

**Tabelle 6-5:** Auswirkungen unterschiedlicher Eisenkonzentrationen auf OD, Ausbeute und Produktivität der 1,3-Propandiolbildung mit IK 123 nach 25 h

$\text{Fe}^{2+}$	Glycerin	PD	Acetat	Butyrat	OD	$Y_{\text{PD}}$ (m/m)	$P_{\text{PD}}$
	verbraucht	gebildet					
[mg/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]			[g/(L·h)]
0,48	14,05	6,15	0,14	1,40	2,29	0,53	0,25
10,52	14,47	7,00	0,22	1,79	1,70	0,59	0,28
65,79	15,67	7,43	0,24	2,08		0,57	0,30
100,96	15,73	7,24	0,31	1,94		0,56	0,29
206,46	6,39	2,11	0,41	0,16		0,40	0,08

### 6.3.2.2 Magnesium ( $\text{Mg}^{2+}$ )



**Abbildung 6-18:** Einfluss der Magnesiumkonzentration auf 1,3–Propandiolbildung und Zellwachstum (Vial, MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>PG<sup>50</sup>, 32 °C, pH 7,50)

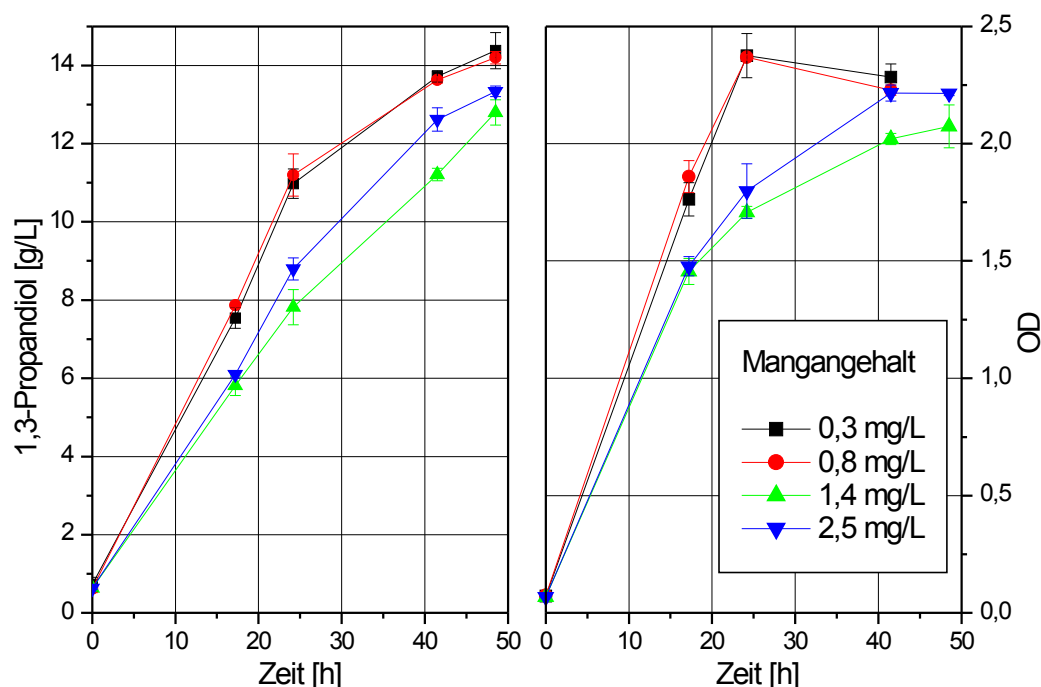
Der Zusatz von Magnesium bewirkt, wie in Abbildung 6-18 sehr gut zu erkennen ist, eine deutliche Steigerung der 1,3-Propandiolbildung. Auch die Produktivität (Tabelle 6-6) steigt von  $0,27 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$  ohne Magnesiumzugabe auf  $0,36 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$  bei einer  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration von  $109,3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . Die optische Dichte nach 17 h (Tabelle 6-6) steigt mit zunehmender Magnesiumkonzentration an. Im Gegensatz dazu ist das Maximum der Ausbeute bei einer Konzentration von  $26,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$  zu finden.

Leider wurde bei der Analyse der Rohglycerinwässer keine Untersuchung bezüglich ihres Magnesiumgehaltes durchgeführt. Aber da im getesteten Konzentrationsbereich von  $13,4$  bis  $109,3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mg}^{2+}$  keine negativen Auswirkungen zu beobachten waren und nicht mit einem sehr hohen Gehalt an Magnesium in den Rohglycerinwässern zu rechnen ist, dürfte der Einfluss des Magnesiumgehaltes auf die Eignung zur Biokonversion keinen Einfluss haben.

**Tabelle 6-6:** Auswirkungen unterschiedlicher Magnesiumkonzentrationen auf OD, Ausbeute und Produktivität der 1,3-Propandiolbildung mit IK 123 nach 17 h

$\text{Mg}^{2+}$	Glycerin	PD	Acetat	Butyrat	OD	$Y_{\text{PD}}$ (m/m)	$P_{\text{PD}}$
	verbraucht	gebildet					
[mg/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]			[g/(L·h)]
0,00	9,71	4,55	0,09	0,71	1,30	0,57	0,27
13,40	11,44	5,48	0,09	1,34	1,41	0,58	0,32
26,80	11,45	5,56	0,00	0,97	1,40	0,59	0,33
53,50	12,93	5,35	0,00	1,41	1,43	0,50	0,31
109,30	12,97	6,16	0,00	1,80	1,60	0,57	0,36

### 6.3.2.3 Mangan ( $\text{Mn}^{2+}$ )



**Abbildung 6-19:** Einfluss der Mangankonzentration auf 1,3-Propandiolbildung und Zellwachstum (Vial, MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>PG<sup>50</sup>, 32 °C, pH 7,50)

Betrachtet man den Einfluss von Mangan auf 1,3-Propandiolbildung und Zellwachstum (Abbildung 6-19), so stellt man fest, dass hohe Konzentrationen an Mangan zu schlechteren Ergebnissen führen als niedrige Konzentrationen. Mangan wirkt also in höheren Konzentrationen hemmend. Die Optima für Produktivität und Ausbeute (Tabelle 6-7) liegen ebenfalls bei den Konzentrationen unter  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mn}^{2+}$ .

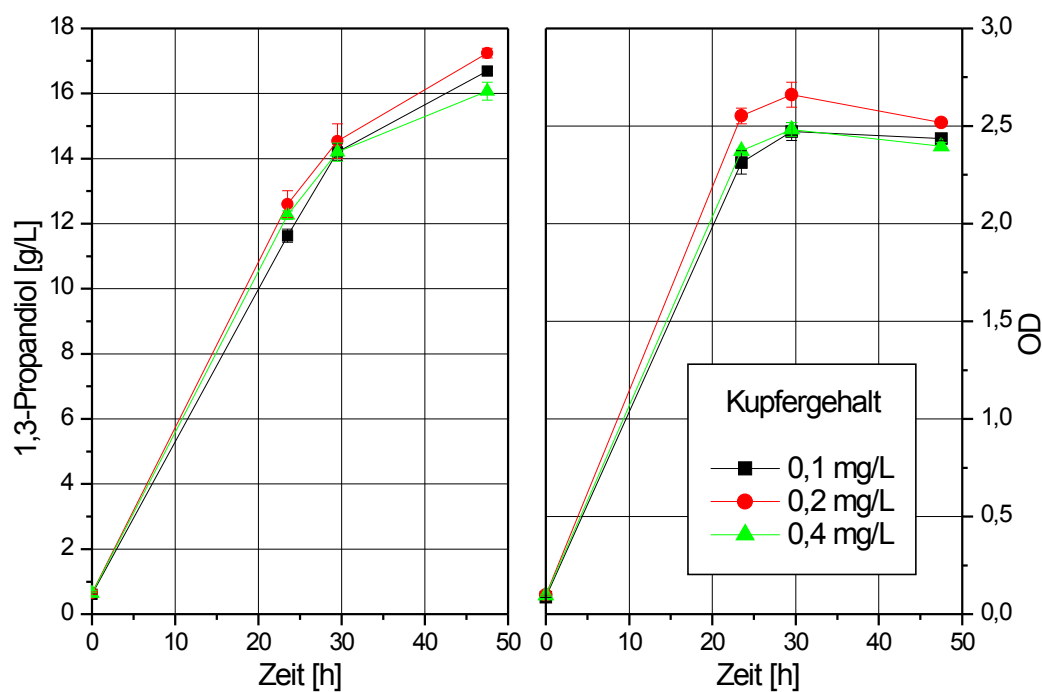
Der Verwendung von Rohglycerinwässern steht, im Bezug auf den Mangangehalt, nichts entgegen, da der nach den Analysenergebnissen (Tabelle 9-1) höchstens zu erwartende Mangangehalt bei unter  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Mn}^{2+}$  liegt und damit unter der aus Abbildung 6-19 ersichtlichen kritischen Konzentration liegt.

**Tabelle 6-7:** Auswirkungen unterschiedlicher Mangankonzentrationen auf OD, Ausbeute und Produktivität der 1,3-Propandiolbildung mit IK 123 nach 19,2 h

Mn <sup>2+</sup>	Glycerin	PD	Acetat	Butyrat	OD	Y <sub>PD</sub> (m/m)	P <sub>PD</sub>
	verbraucht	gebildet					
[mg/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]			[g/(L·h)]
0,30	13,15	6,82	0,63	1,60	1,76	0,63	0,36
0,80	13,78	7,25	0,61	1,74	1,86	0,64	0,38
1,40	11,07	5,18	0,02	1,62	1,46	0,57	0,27
2,50	11,55	5,47	0,04	1,71	1,48	0,57	0,28

#### 6.3.2.4 Kupfer (Cu<sup>2+</sup>)

Sowohl hinsichtlich der 1,3-Propandiolbildung und des Zellwachstums (Abbildung 6-20), als auch im Bezug auf Ausbeute und Produktivität (Tabelle 6-8) gibt es im getesteten Konzentrationsbereich von 0,1 bis 0,4 mg · L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> keinen nennenswerten Einfluss der Kupferkonzentration auf die Biokonversion. Das Optimum der Produktivität und des Zellwachstums (Optische Dichte) liegt bei einer mittleren Konzentration von 0,2 mg · L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>, während die molare Ausbeute bei der höchsten getesteten Kupferkonzentration am besten ist. In den getesteten Rohglycerinwässern wurden Kupferkonzentrationen kleiner 1 mg · L<sup>-1</sup> gemessen. Da dies hochkonzentrierte Rohglycerinwässer waren, welche also nur stark verdünnt eingesetzt würden, ist eine Beeinflussung der Biokonversion durch den unterschiedlichen Kupfergehalt der Rohglycerinwässer nahezu ausgeschlossen.

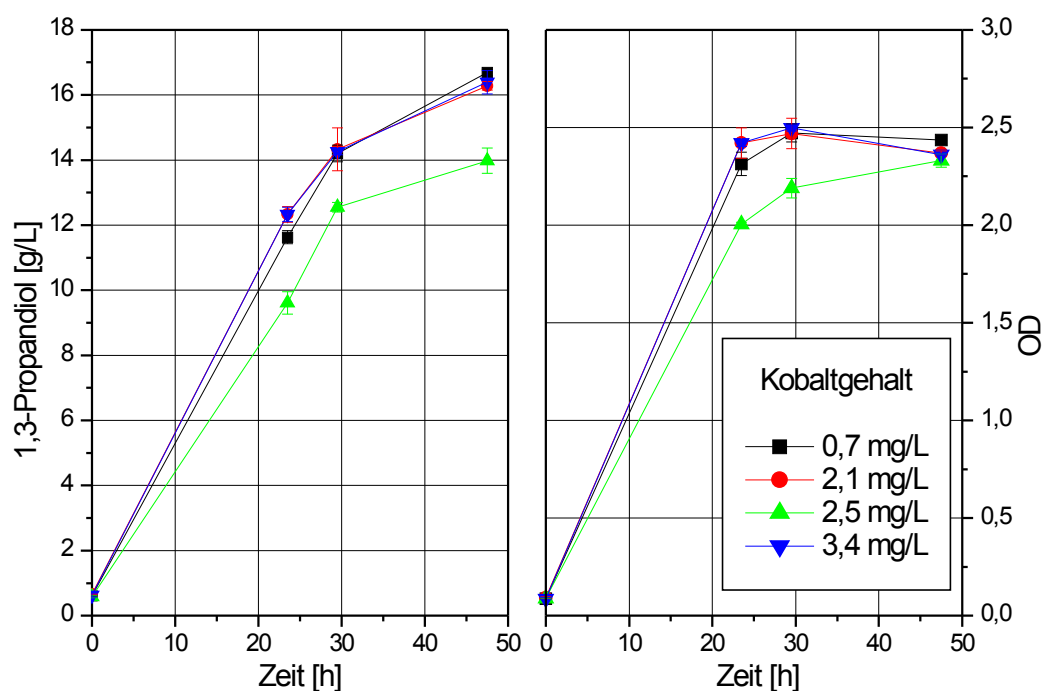


**Abbildung 6-20:** Einfluss der Kupferkonzentration auf 1,3-Propandiolbildung und Zellwachstum (Vial, MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>PG<sup>50</sup>, 32 °C, pH 7,50)

**Tabelle 6-8:** Auswirkungen unterschiedlicher Kupferkonzentrationen auf OD, Ausbeute und Produktivität der 1,3-Propandiolbildung mit IK 123 nach 23,5 h

Cu <sup>2+</sup>	Glycerin	PD	Acetat	Butyrat	OD	Y <sub>PD</sub> (m/m)	P <sub>PD</sub>
	verbraucht	gebildet					
[mg/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]			[g/(L·h)]
0,10	21,84	11,02	0,54	2,45	2,31	0,61	0,47
0,20	24,11	11,99	0,44	3,07	2,55	0,60	0,51
0,40	22,39	11,63	0,59	2,84	2,37	0,63	0,49

### 6.3.2.5 Kobalt ( $\text{Co}^{2+}$ )



**Abbildung 6-21:** Einfluss der Kobaltkonzentration auf 1,3-Propandiolbildung und Zellwachstum (Vial, MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>PG<sup>50</sup>, 32 °C, pH 7,50)

**Tabelle 6-9:** Auswirkungen unterschiedlicher Kobaltkonzentrationen auf OD, Ausbeute und Produktivität der 1,3-Propandiolbildung mit IK 123 nach 23 h

$\text{Co}^{2+}$	Glycerin	PD	Acetat	Butyrat	OD	$Y_{\text{PD}}$ (m/m)	$P_{\text{PD}}$
	verbraucht	gebildet					
[mg/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]			[g/(L·h)]
1,70	21,84	11,02	0,54	2,54	2,31	0,61	0,65
2,10	22,45	11,67	0,55	2,79	2,42	0,63	0,69
2,50	19,21	9,02	0,22	2,75	2,00	0,57	0,53
3,40	22,55	11,69	0,62	2,76	2,42	0,63	0,69



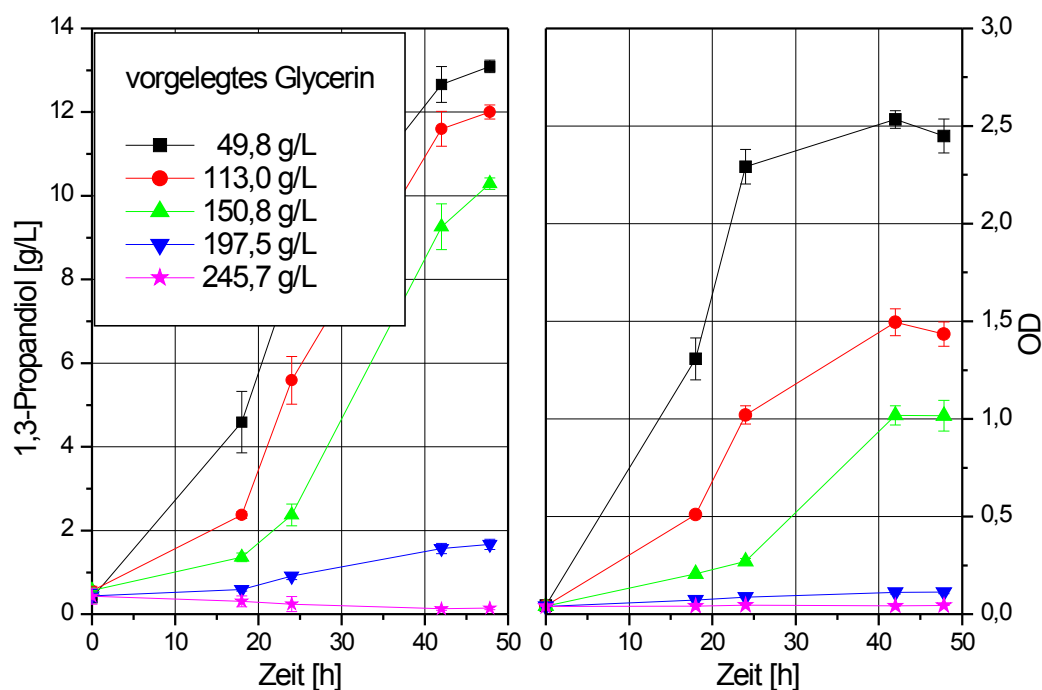
Betrachtet man die Kurvenverläufe für 1,3-Propandiolbildung und Zellwachstum in Abbildung 6-21, so fällt auf, dass die Kurven mit einer Ausnahme nahezu identisch verlaufen. Schreibt man die abweichenden Werte bei der Konzentration von  $2,5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Co}^{2+}$  einem Fehler in der Versuchsdurchführung zu, so ergibt sich kein Einfluss der  $\text{Co}^{2+}$ -Konzentration im untersuchten Konzentrationsbereich. Dies gilt analog für Ausbeute und Produktivität (Tabelle 6-9).

### 6.3.3 Hemmung durch Substrat und Produkte

Zur Untersuchung der hemmenden Einflüsse, die durch hohe Konzentrationen des Substrates oder der Produkte auftreten, wurde Mineralsalzmedium (MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>PG pH 7,5) mit unterschiedlichen Gehalten an Glycerin (Substrathemmung) oder den Produkten 1,3-Propandiol, Acetat oder Butyrat (Produkthemmung) hergestellt. Die untersuchten Konzentrationen sind in Tabelle 5-4 dargestellt. Nach dem Animpfen aus einer ca. 16 h alten Kultur von IK 123 wurde der Verlauf der 1,3-Propandiolbildung und des Zellwachstums während der Inkubation im Wasserbad bei 32 °C analysiert.

#### 6.3.3.1 Hemmung durch das Substrat Glycerin

Der Einfluss der Startkonzentration an Glycerin auf die 1,3-Propandiolbildung und das Wachstum von IK 123 ist in Abbildung 6-22 sehr deutlich zu erkennen. Eine Steigerung der Startkonzentration von 50 auf  $110 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  führt nach 18 h zu einer um 62 % reduzierten 1,3-Propandiolbildung (Tabelle 6-10). Auch das Zellwachstum wird in der gleichen Größenordnung gehemmt. Bei einer Erhöhung auf  $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Glycerin steigt die Substrathemmung auf über 80 % an. Bei einer Konzentration von  $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  findet kaum noch Zellwachstum statt, bei  $250 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Glycerin ist die Hemmung vollständig. Da die 1,3-Propandiolbildung wachstumsgekoppelt ist, wirkt sich eine Wachstumshemmung entsprechend auch auf die Produktivität aus (Tabelle 6-10). Eine Auswirkung auf die Ausbeute ist nicht zu beobachten. Die niedrigere Ausbeute von 33 % bei  $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Glycerin nach 18 h steigerte sich im weiteren Versuchverlauf auf 62 % und war so mit den anderen Ausbeuten vergleichbar.



**Abbildung 6-22:** Verlauf von 1,3-Propandiolbildung und Zellwachstum in Abhängigkeit von der Startkonzentration an Glycerin (Vial, MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>PG, 32 °C, pH 7,50)

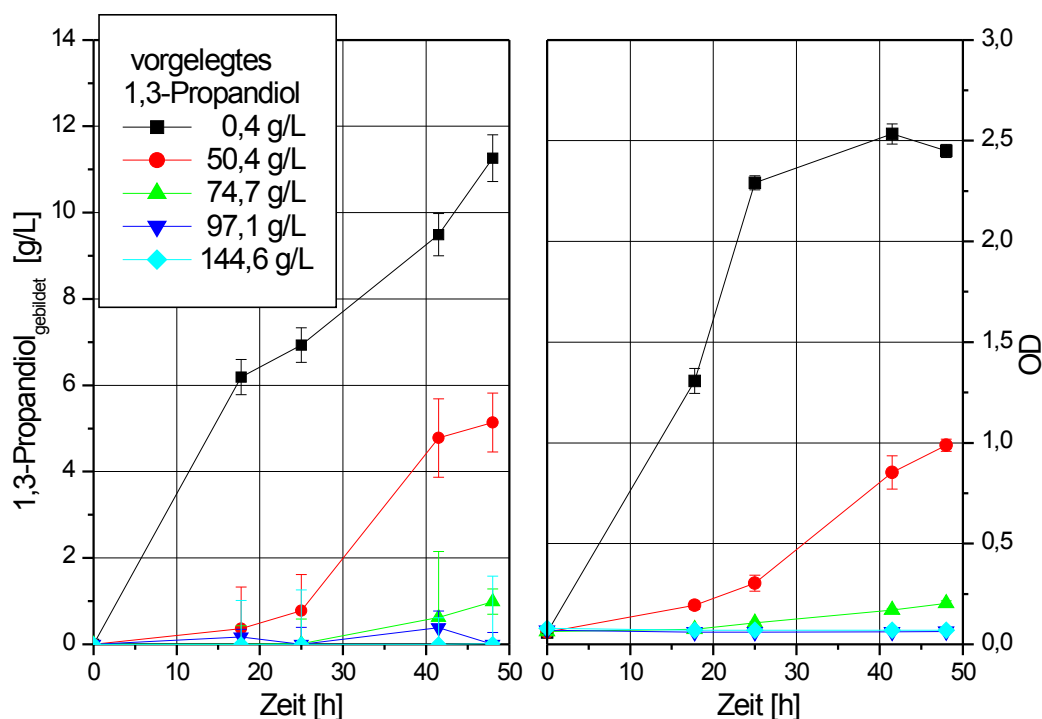
**Tabelle 6-10:** Auswirkungen verschiedener Glycerinstartkonzentrationen auf OD, Ausbeute und Produktivität der 1,3-Propandiolbildung mit IK 123 nach 18 h

Glycerin	Glycerin	PD	Acetat	Butyrat	OD	Y <sub>PD</sub> (m/m)	P <sub>PD</sub>
	verbraucht	gebildet					
[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]			[g/(L·h)]
49,80	8,55	4,21	0,37	0,85	1,31	0,60	0,23
113,00	3,12	1,61	0,01	0,16	0,51	0,62	0,09
150,80	2,89	0,78	0,00	0,01	0,21	0,33	0,04
200,11	0,00	0,15	0,00	0,00	0,07		0,01
249,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04		0,00

### 6.3.3.2 Hemmung durch die Produkte

Zur Untersuchung der Hemmwirkung der Produkte wurde Mineralsalzmedium (MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>PG<sup>50</sup> pH 7,5) mit unterschiedlichem Gehalt an diesen Produkten (Tabelle 5-4) getestet. Dabei wurden 1,3-Propandiolbildung und Zellwachstum in Abhängigkeit von der Produktkonzentration bestimmt.

#### 6.3.3.2.1 1,3-Propandiol



**Abbildung 6-23:** Verlauf von 1,3-Propandiolbildung und Zellwachstum in Abhängigkeit von der vorgelegten Konzentration an 1,3-Propandiol (Vial, MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>PG<sup>50</sup>, 32 °C, pH 7,50)

Die Hemmwirkung des Hauptproduktes 1,3-Propandiol ist, wie in Abbildung 6-23 deutlich zu sehen, nicht zu vernachlässigen. Schon bei einer Konzentration von  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  1,3-Propandiol ist das Zellwachstum, und damit die 1,3-Propandiolbildung,

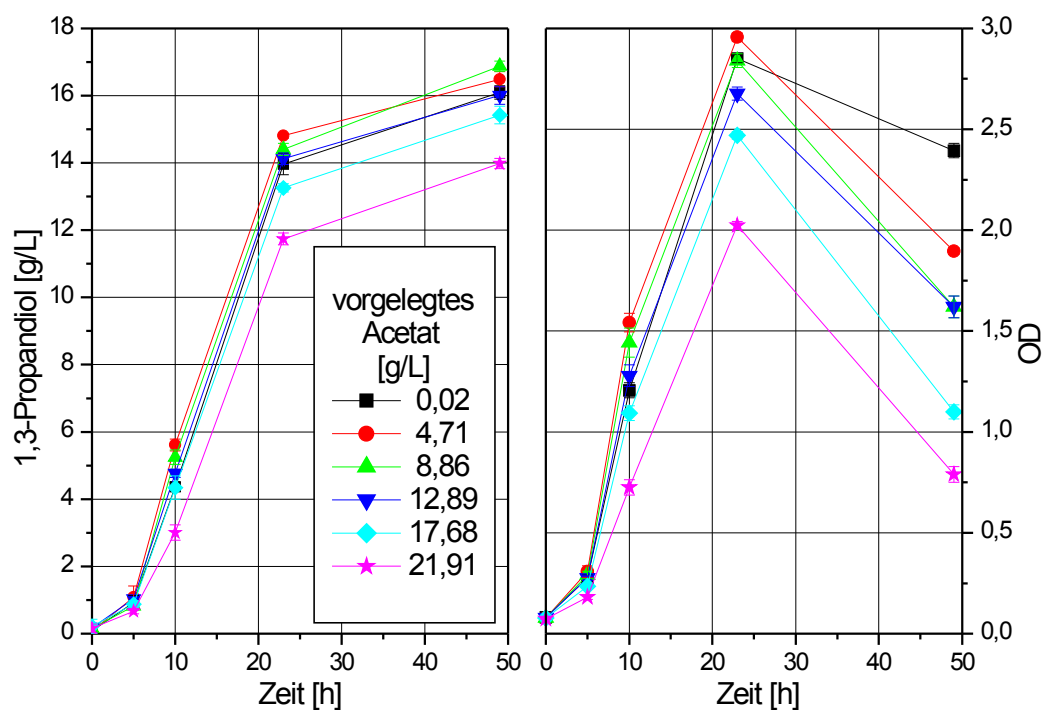
stark gehemmt. Nach 18 h ist noch kaum 1,3-Propandiolbildung zu beobachten, und das Zellwachstum ist um 90 % reduziert. Diese Reduktion des Zellwachstums verringert sich im Versuchsverlauf auf 60 %. Bei einer Konzentration von  $75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  1,3-Propandiol ist nur noch ein schwaches Zellwachstum festzustellen und die Produktivität ist auf annähernd Null abgesunken. Bei  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  1,3-Propandiol ist kein Zellwachstum mehr feststellbar, lediglich die Bildung von Sporen findet noch statt. Ab  $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  erfolgt auch keine 1,3-Propandiolbildung mehr.

**Tabelle 6-11:** Auswirkungen verschiedener 1,3-Propandiolkonzentrationen auf OD, Ausbeute und Produktivität der 1,3-Propandiolbildung mit IK 123 nach 17,75 h

PD	Glycerin	PD	Acetat	Butyrat	OD	$Y_{PD}$ (m/m)	$P_{PD}$
	verbraucht	gebildet					
[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]			[g/(L·h)]
0,40	11,10	6,19	0,29	1,56	1,31	0,67	0,35
50,40	1,06	0,36	0,00	0,00	0,19	0,41	0,02
74,70	0,34	0,03	0,04	0,00	0,07	0,11	0,00
97,10	0,04	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00
144,60	0,28	0,00	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00

#### 6.3.3.2.2 Acetat

Die Wirkung (Abbildung 6-24) des Nebenproduktes Acetat auf Zellwachstum und 1,3-Propandiolbildung ist interessant. Vorgelegte Konzentrationen bis  $13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  steigern in der Anfangsphase des Versuches 1,3-Propandiolbildung und Zellwachstum. Betrachtet man die ersten 10 Stunden (Tabelle 6-12), so zeigt sich, dass hier eine Steigerung der Produktivität um 30 % erfolgt. Das Zellwachstum lässt sich in den ersten 10 Stunden durch Zugabe von  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Acetat um fast 30 % steigern. Bei Konzentrationen von mehr als  $13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Acetat tritt eine Hemmung der 1,3-Propandiolbildung und des Zellwachstums auf.

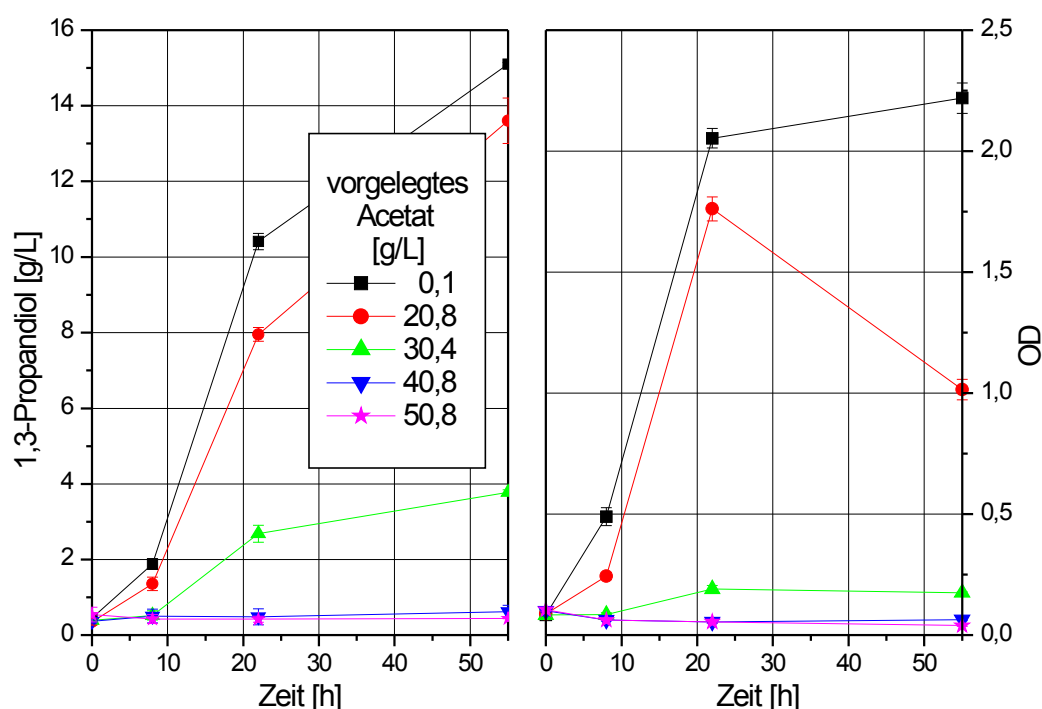


**Abbildung 6-24:** Verlauf von 1,3-Propandiolbildung und Zellwachstum bei vorgelegten Acetat-Konzentrationen im Bereich von 0 – 20 g · L<sup>-1</sup> (Vial, MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>PG<sup>50</sup>, 32 °C, pH 7,50)

**Tabelle 6-12:** Auswirkungen verschiedener Acetatkonzentrationen im Bereich von 0 – 20 g · L<sup>-1</sup> auf OD, Ausbeute und Produktivität der 1,3-Propandiolbildung mit IK 123 nach 10 h

Acetat	Glycerin	PD	Acetat	Butyrat	OD	Y <sub>PD</sub> (m/m)	P <sub>PD</sub>
	verbraucht	gebildet					
[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]			[g/(L·h)]
0,02	8,10	4,28	0,96	1,00	1,21	0,64	0,43
4,71	11,17	5,53	0,23	1,64	1,54	0,60	0,55
8,86	10,42	5,10	0,20	1,62	1,44	0,59	0,51
12,89	9,86	5,59	0,00	1,65	1,28	0,69	0,56
17,68	7,99	4,13	0,00	1,48	1,09	0,63	0,41
21,91	5,04	2,84	0,00	1,02	0,73	0,68	0,28

Der Zusatz von mehr als  $13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Acetat führt zur Hemmung von 1,3-Propandiolbildung und Zellwachstum (Abbildung 6-24, Abbildung 6-25). Bereits  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Acetat hemmen in den ersten Stunden die 1,3-Propandiolbildung um 90 % (Tabelle 6-13). Bei  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  findet nur noch eine minimale 1,3-Propandiolproduktion statt, welche bei Konzentrationen ab  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Acetat total gehemmt wird. Ein Zellwachstum ist bereits ab Konzentrationen von  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Acetat nicht mehr zu beobachten. Es lässt sich allerdings kein deutlicher Einfluss der Acetatkonzentration auf die Ausbeute erkennen.



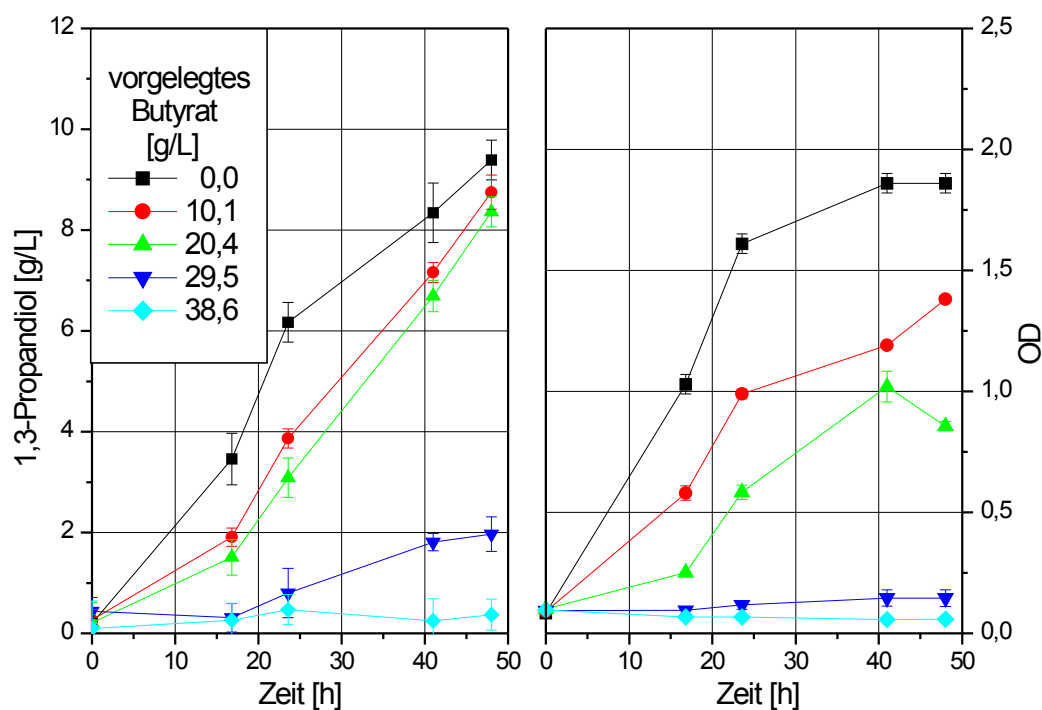
**Abbildung 6-25:** Verlauf von 1,3-Propandiolbildung und Zellwachstum bei vorgelegten Acetat-Konzentrationen im Bereich von  $0 - 50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  (Vial, MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>PG<sup>50</sup>, 32 °C, pH 7,50)

**Tabelle 6-13:** Auswirkungen verschiedener Acetatkonzentrationen im Bereich von 0 – 50 g · L<sup>-1</sup> auf OD, Ausbeute und Produktivität der 1,3-Propandiolbildung mit IK 123 nach 8 h

Acetat	Glycerin	PD	Acetat	Butyrat	OD	Y <sub>PD</sub> (m/m)	P <sub>PD</sub>
	verbraucht	gebildet					
[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]			[g/(L·h)]
0,10	6,09	1,43	0,46	0,30	0,49	0,28	0,18
20,80	5,01	1,01	0,47	0,00	0,24	0,24	0,13
30,40	3,96	0,13	0,50	0,07	0,08	0,04	0,02
40,80	3,12	0,13	0,18	0,00	0,06	0,05	0,02
50,80	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06		0,00

### 6.3.3.2.3 Butyrat

Die Hemmwirkung des Nebenproduktes Butyrat ist, wie in Abbildung 6-26 zu sehen, deutlich ausgeprägt. Schon bei einer Konzentration von 10 g · L<sup>-1</sup> Butyrat ist das Zellwachstum, und damit die 1,3-Propandiolbildung, in den ersten Stunden stark gehemmt. Nach 17 Stunden ist eine um 52 % verringerte 1,3-Propandiolbildung zu beobachten, und das Zellwachstum ist um 46 % reduziert (Tabelle 6-14). Bei einer Konzentration von 30 g · L<sup>-1</sup> Butyrat ist nur noch ein schwaches Zellwachstum festzustellen, die Produktivität ist auf annähernd Null abgesunken. Bei 40 g · L<sup>-1</sup> Butyrat ist kein Zellwachstum mehr feststellbar. Die molare Ausbeute sinkt mit zunehmender Butyratkonzentration.



**Abbildung 6-26:** Verlauf von 1,3-Propandiolbildung und Zellwachstum in Abhängigkeit von der vorgelegten Konzentration an Butyrat (Vial, MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>PG<sup>50</sup>, 32 °C, pH 7,50)

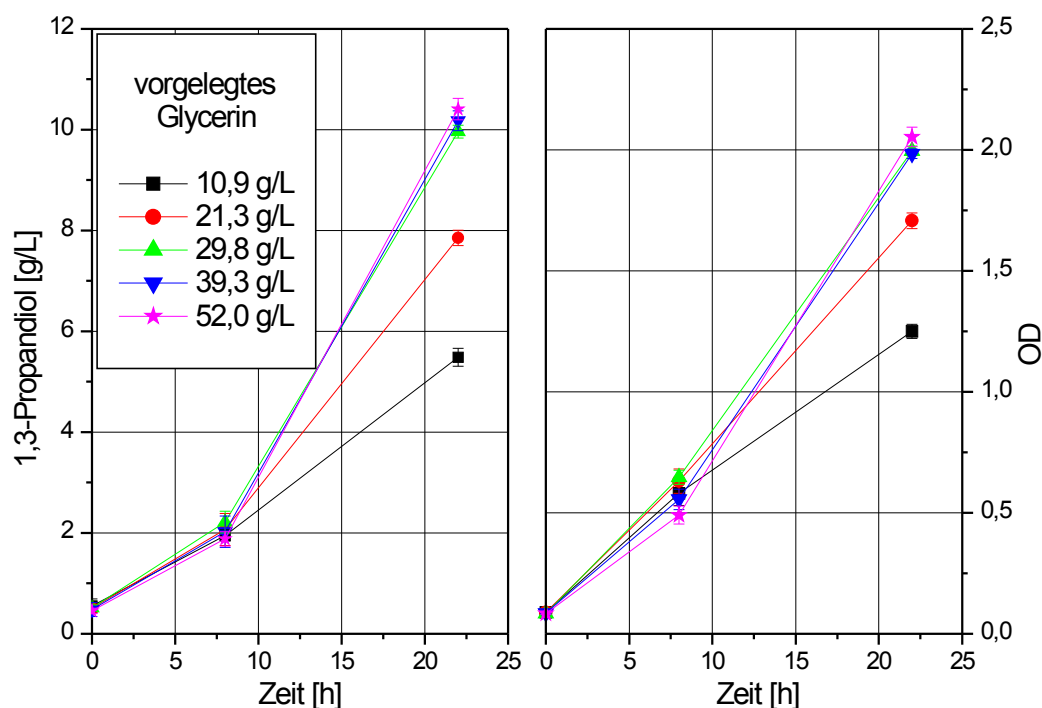
**Tabelle 6-14:** Auswirkungen verschiedener Butyratkonzentrationen auf OD, Ausbeute und Produktivität der 1,3-Propandiolbildung mit IK 123 nach 16,8 h

Butyrat	Glycerin	PD	Acetat	Butyrat	OD	Y <sub>PD</sub> (m/m)	P <sub>PD</sub>
	verbraucht	gebildet					
[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]			[g/(L·h)]
0,00	5,80	3,46	0,48	0,21	1,06	0,69	0,21
10,10	3,28	1,65	0,34	0,17	0,59	0,61	0,10
20,40	2,54	1,05	0,02	0,00	0,25	0,50	0,06
29,50	1,02	0,42	0,00	0,00	0,10	0,49	0,02
38,60	0,41	0,16	0,00	0,00	0,07	0,47	0,01



### 6.3.4 Substratlimitierung

Um die ideale Glycerinstartkonzentration zu ermitteln, wurde Mineralsalzmedium (MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>PG pH 7,5) mit unterschiedlichem Gehalt an Glycerin im Bereich von 10 bis 50 g · L<sup>-1</sup>) getestet und die Auswirkungen dieser Konzentrationen auf 1,3-Propandiolbildung und Zellwachstum untersucht. Die Ergebnisse, dargestellt in Abbildung 6-27 und Tabelle 6-15, zeigen, dass das Zellwachstum in den ersten 8 Stunden bei einer Erhöhung der Glycerinstartkonzentration von 10 auf 30 g · L<sup>-1</sup> zunimmt, um bei höheren Glycerinkonzentrationen wieder abzunehmen. Auch das Maximum der Produktivität liegt bei einer Glycerinstartkonzentration von 30 g · L<sup>-1</sup>.



**Abbildung 6-27:** Verlauf von 1,3-Propandiolbildung und Zellwachstum in Abhängigkeit von der Startkonzentration an Glycerin. Die Messwerte nach 24 h für die Startkonzentrationen von 10,9 und 21,3 g/L sind ohne Bedeutung, da das Glycerin hier bereits weitestgehend umgesetzt wurde. (Vial, MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>PG, 32 °C, pH 7,50)

Die Unterschiede zwischen 10 und 30 g · L<sup>-1</sup> betragen 15 % bei der Produktivität und 12 % beim Zellwachstum. Bei Glycerinstartkonzentrationen von unter 30 g · L<sup>-1</sup> liegt eine Substratlimitierung, bei über 30 g · L<sup>-1</sup> eine Substrathemmung vor. Bei diesem Versuch lässt nur der Verlauf in den ersten Stunden eine Aussage über eine eventuelle Substratlimitierung zu, da im weiteren Versuchsverlauf bei niedrigen Substratkonzentrationen das Glycerin vollständig umgesetzt wurde.

**Tabelle 6-15:** Auswirkungen verschiedener Glycerinstartkonzentrationen auf OD, Ausbeute und Produktivität der 1,3-Propandiolbildung mit IK 123 nach 8 h

Glycerin	Glycerin	PD	Acetat	Butyrat	OD	Y <sub>PD</sub> (m/m)	P <sub>PD</sub>
	verbraucht	gebildet					
[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]	[g/L]			[g/(L·h)]
10,93	3,09	1,40	0,23	0,37	0,58	0,55	0,18
21,27	3,37	1,56	0,40	0,34	0,63	0,56	0,20
29,77	2,94	1,70	0,40	0,21	0,65	0,70	0,21
39,34	2,96	1,54	0,37	0,46	0,56	0,63	0,19
51,95	6,09	1,43	0,46	0,30	0,49	0,28	0,18

### 6.3.5 Verwendung von Co-Substraten

Der Einsatz von kostengünstigen Co-Substraten als zusätzliche C-Quelle stellt eine Möglichkeit dar, die Kosten für Biokonversionsverfahren zu senken. Um zu testen, ob dies auch für die 1,3-Propandiolbildung aus Glycerin nutzbar ist, wurden die Auswirkungen des Zusatzes von Molkepermeat untersucht. Molkepermeat, das neben Salzen einem hohen Lactoseanteil enthält, wurde dabei dem Mineralsalzmedium (MinS<sup>66</sup>N<sup>10</sup>PG<sup>25</sup>) zugesetzt und die 1,3-Propandiolbildung bei der Biokonversion im Vial ohne pH-Korrektur mit IK 123 mittels HPLC-Analytik quantifiziert. Die in Tabelle 6-16 dargestellten Ergebnisse nach 40 h Versuchsdauer zeigen recht deutlich, welche Veränderungen durch den Zusatz von Co-Substraten erzielt werden können. So lässt sich die molare Ausbeute auf bis zu 100 % erhöhen.

**Tabelle 6-16** Auswirkungen des Co-Substrats Lactose auf die Ausbeute der 1,3-Propandiolbildung nach 40 h Versuchsdauer im Vial ohne pH-Korrektur

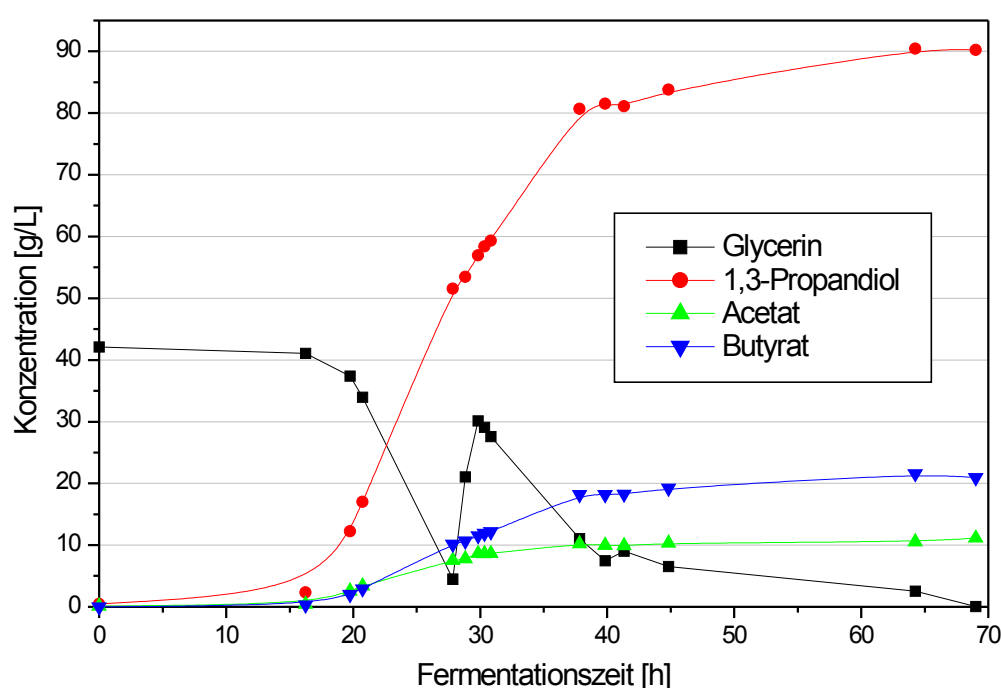
Anfangskonzentration Lactose [g/L]	0,00	3,80	9,39	18,58	27,65
Anfangskonzentration Glycerin [g/L]	24,64	23,48	23,88	24,20	24,73
Glycerinabnahme [g/L]	17,89	3,91	2,87	4,14	3,73
Lactoseabnahme [g/L]	0,00	3,80	5,62	4,53	2,36
Propandiol [g/L]	9,27	2,61	2,39	2,71	2,84
Acetat [g/L]	0,43	0,54	0,92	0,73	0,82
Butyrat [g/L]	2,43	2,28	3,15	3,44	3,07
$Y_{w/w}$ [%]	51,78	66,93	83,00	71,39	74,97
$Y_{m/m}$ [%]	62,67	81,00	100,44	86,40	90,73

Es zeigt sich aber auch, dass der Zusatz von Molkepermeat das Zellwachstum und die daran gekoppelte 1,3-Propandiolbildung hemmt, die im Vial erreichte Endkonzentration an 1,3-Propandiol liegt beim Zusatz von Lactose bei unter 25 % der maximal möglichen Endkonzentration. Dies liegt an der mit der Zugabe von Zuckern unvermeidlichen höheren Produktion an organischen Säuren. Bei diesem Experiment wurden ähnliche Konzentrationen an Essigsäure und Buttersäure nach einem Viertel des produzierten 1,3-Propandiols erhalten. Dies führte, da die Experimente im Vial ohne pH-Korrektur durchgeführt wurden, zum Absterben der Zellen durch das Absinken des pH-Wertes, bevor eine größere Menge 1,3-Propandiol gebildet werden konnte. Eine Extrapolation dieser Ergebnisse auf die Verwendung von Co-Substraten in der Fermentation lässt erwarten, dass dieser Effekt der verstärkten Säurebildung auch bei der fermentativen 1,3-Propandiolproduktion auftritt. Daraus folgt, dass für batch- und fed-batch-Fermentationen die Verwendung von zuckerhaltigen Co-Substraten als bedingt geeignet erscheint, da das Auftreten von kritischen Säurekonzentrationen (siehe 6.3.3.2.2 und 6.3.3.2.3) zu erwarten ist. Dennoch zeigt die Erhöhung der Ausbeute auf Werte oberhalb der theoretischen Maximalausbeute sehr gut, welches Potential die Verwendung von Co-Substraten bei Biokonversionsprozessen hat. Die in Tabelle 6-16 auftretende molare Ausbeute von mehr als 100 % kommt wahrscheinlich durch die Mittelung der Ergebnisse der Parallelversuche.

## 6.4 Biokonversion mit dem Stamm IK 123

### 6.4.1 Testfermentation mit dem Stamm IK 123

Der letzte der beim Screening gefundenen Stämme (IK 123) wurde parallel zur Optimierung von IK 96 entdeckt. Er wurde deshalb mit den für IK 96 optimalen Bedingungen getestet. Die Ergebnisse dieses Tests sind in Abbildung 6-28 dargestellt.

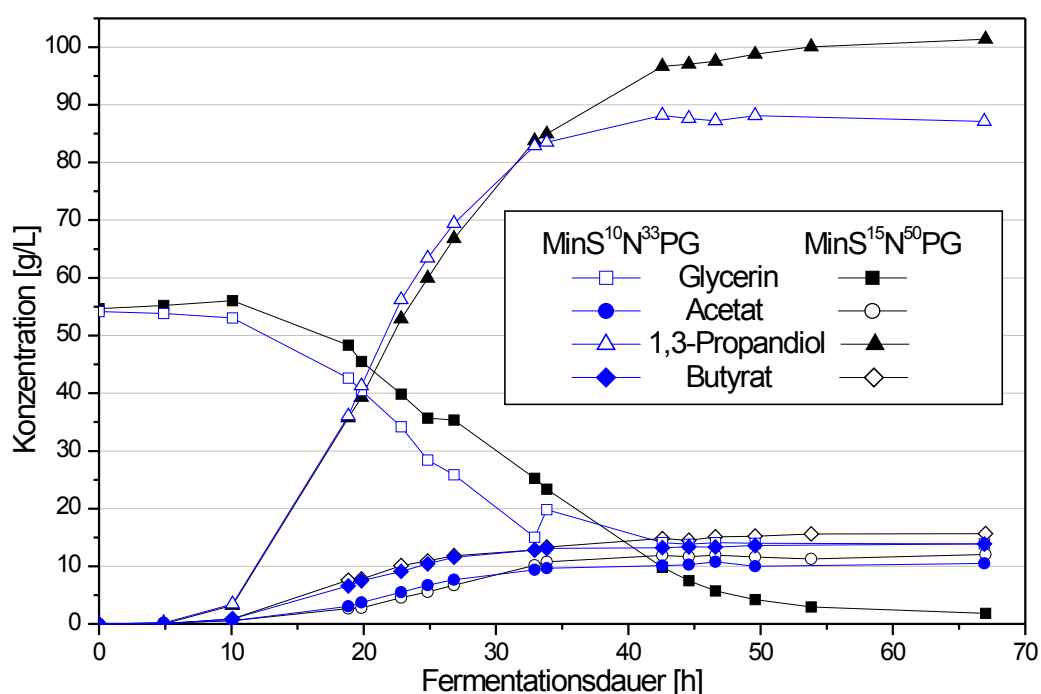


**Abbildung 6-28:** Fed-batch-Fermentation von IK 123 (MinS<sup>10</sup>N<sup>33</sup>PG, 32 °C, pH 7,0, Feed: 80 %iges Pharmaglycerin mit 40 g · L<sup>-1</sup> Hefeextrakt)

Es zeigte sich, dass der getestete Stamm IK 123 leistungsfähiger als der Stamm IK 96 war. Es wurde auf Anhieb eine 1,3-Propandiolkonzentration von 90,4 g · L<sup>-1</sup> erreicht. Die molare Ausbeute lag bei 61 %. Aufgrund dieses guten Ergebnisses wurde die Optimierung der Fermentationsparameter für IK 96 eingestellt und begonnen, die optimalen Parameter für den Stamm IK 123 zu bestimmen.

### 6.4.2 Erhöhung der Konzentrationen der Medienbestandteile (IK 123)

Die mit IK 123 erreichten Endkonzentrationen hatten mit  $90 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  1,3-Propandiol das 1,5-fache der maximalen Endkonzentration vor Beginn der Optimierungen (Vergleiche *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 nicht adaptiert, Abbildung 6-8) erreicht. Deshalb wurde getestet, ob die Verwendung von Mineralsalzmedium  $\text{MinS}^{15}\text{N}^{50}$  (siehe Tabelle 4-1), einer Variante des Mineralsalzmediums  $\text{MinS}^{10}\text{N}^{33}$  mit 1,5facher Konzentration an Salzen, zu einer Verbesserung des Resultats führen könnte. Um einen zufälligen Effekt, wie zum Beispiel den Zustand der Vorkultur, auszuschließen, wurde das Fermentersystem für den Parallelbetrieb von zwei Fermentern umgerüstet (siehe 4.10.4). Dies ermöglichte es, die folgenden Fermentationen zeitgleich unter Verwendung der gleichen Vorkultur durchzuführen.



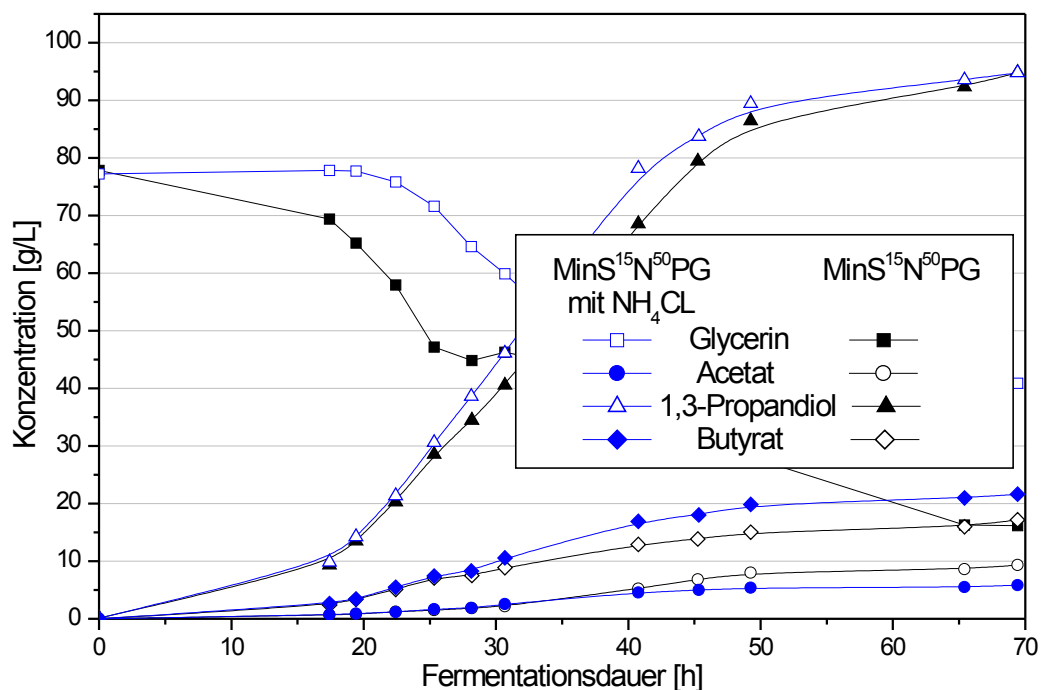
**Abbildung 6-29:** Vergleich der fed-batch-Fermentationen von IK 123 mit den Medien  $\text{MinS}^{10}\text{N}^{33}\text{PG}$  und  $\text{MinS}^{15}\text{N}^{50}\text{PG}$  bei pH 7,0 und 32 °C (Feed: 80 %iges Pharmaglycerin mit  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Hefeextrakt)

Wie aus Abbildung 6-29 hervorgeht, steigerte die Verwendung des höher konzentrierten Mediums 2 die 1,3-Propandiolendkonzentration auf  $101,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Auch die molare Ausbeute stieg von 64,5 auf 68,2 %. Die durchschnittliche Produktivität

lag bei  $1,51 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ . Ein Einfluss der Mediumsänderung auf Lag-Phase und Zellwachstum konnte nicht beobachtet werden.

### 6.4.3 Zusatz von Ammoniumchlorid zum Feed

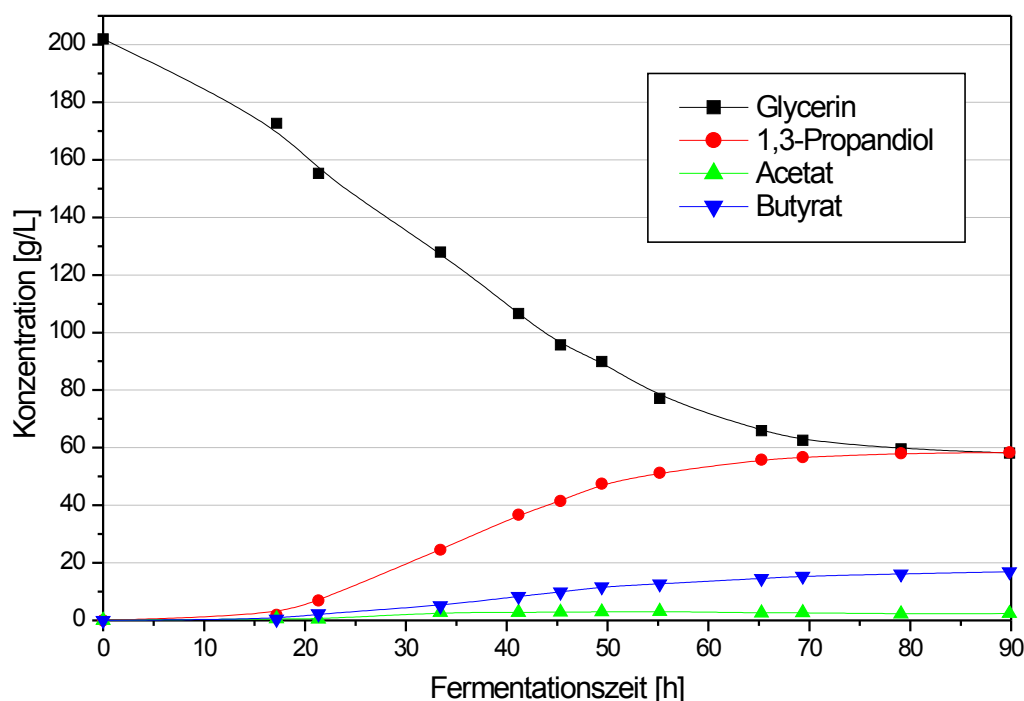
Da eine Erhöhung der Salzkonzentrationen schon eine deutliche Verbesserung des Ergebnisses gebracht hatte, wurde versucht, durch die Zugabe von  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Ammoniumchlorid zum Feed eine weitere Steigerung der Endkonzentration an 1,3-Propandiol zu erreichen. Dieses Experiment führte, wie in Abbildung 6-30 zu sehen ist, nicht zu einer Verbesserung im Bezug auf die 1,3-Propandiolkonzentration. Es wurde auch keine Optimierung der Ausbeute oder der Produktivität erreicht. In Hinsicht auf die Ausbeute war das zusätzliche Ammoniumchlorid sogar kontraproduktiv, da es zu eine Verschiebung des Acetat/Butyrat-Verhältnisses in Richtung Butyrat führte. Von einer weiteren Veränderung der Medienzusammensetzung wurde deshalb abgesehen und die nachfolgende Experimente mit dem unveränderten Mineralsalzmedium  $\text{MinS}^{15}\text{N}^{50}$  (Tabelle 4-1) durchgeführt.



**Abbildung 6-30:** Einfluss von zusätzlichem  $\text{NH}_4\text{Cl}$  im Feed auf den Fermentationsverlauf von IK 123 ( $\text{MinS}^{15}\text{N}^{50}\text{PG}$ ,  $32^\circ\text{C}$ , pH 7,0, Feed: 80 %iges Pharmaglycerin mit  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Hefeextrakt)

#### 6.4.4 Batch-Fermentation mit IK 123

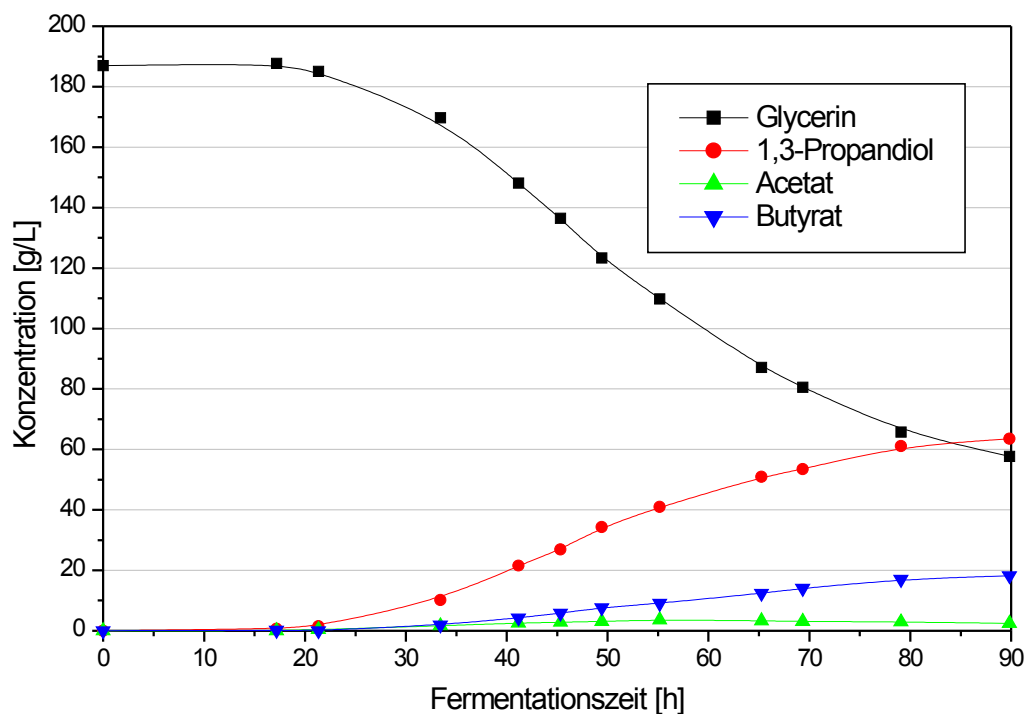
Nachdem es nun im fed-batch-Experiment gelungen war, 1,3-Propandiolendkonzentrationen von über  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  zu erreichen, stellte sich die Frage, ob es nicht möglich wäre, dies auch in einer einfachen batch-Fermentation zu erreichen. Dazu wurde eine batch-Fermentation mit einer Ausgangskonzentration von  $205 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Glycerin durchgeführt. Diese Konzentration an Glycerin hätte bei einer molaren Ausbeute von 60 % zur Bildung von  $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ausgereicht. Abbildung 6-31 zeigt den Verlauf dieser batch-Fermentation. Es zeigte sich, dass diese batch-Fermentation nur zu einer 1,3-Propandiolkonzentration von  $58,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  führte und eine Glycerin-Restkonzentration von  $58 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  nicht umgesetzt wurde. Die molare Ausbeute lag nur bei 49,1 % und die Fermentationsdauer stieg auf 90 Stunden an. Die durchschnittliche Produktivität lag bei  $0,65 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ .



**Abbildung 6-31:** Batch-Fermentation mit IK 123 (MinS<sup>15</sup>N<sup>50</sup>PG<sup>200</sup>, 32 °C, pH 7,0)

### 6.4.5 Batch-Fermentation mit Rohglycerinwasser

Parallel zur batch-Fermentation mit Pharmaglycerin wurde eine batch-Fermentation mit Rohglycerinwasser durchgeführt. Es handelte sich um ein Rohglycerinwasser aus einer Fettspaltungsanlage analog zu dem in Kapitel 6.1.3 als CF2 gekennzeichneten Rohglycerinwasser. Die Ausgangskonzentration an Glycerin lag hier bei  $187 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ .



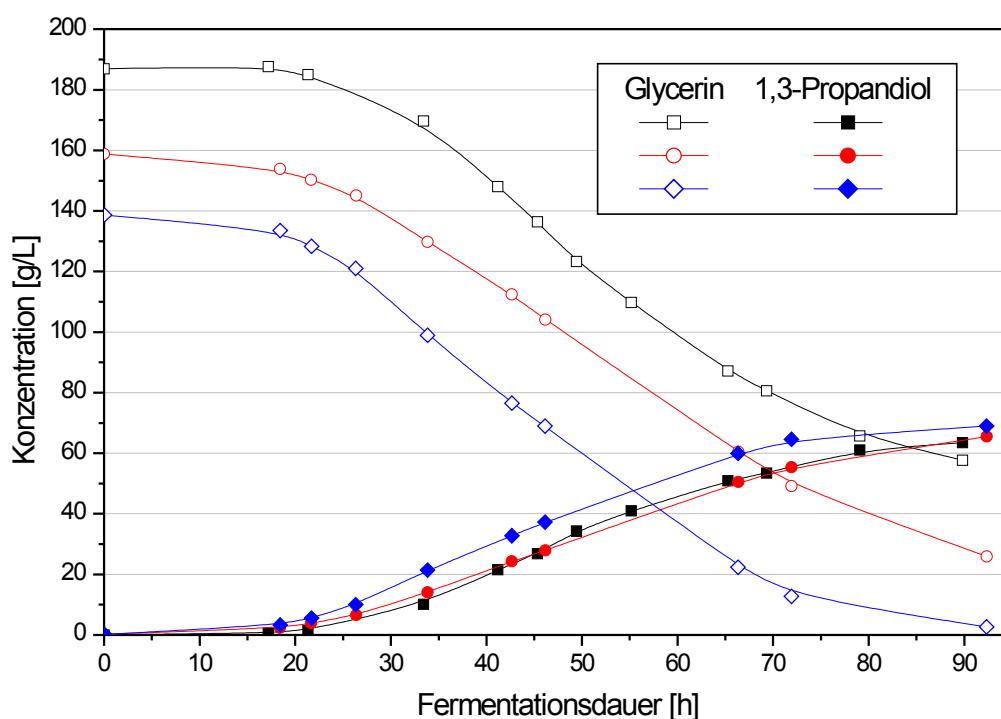
**Abbildung 6-32:** batch-Fermentation mit IK 123 unter Verwendung von Rohglycerinwasser (MinS<sup>15</sup>N<sup>50</sup>RG<sup>190</sup>, 32 °C, pH 7,0)

Diese batch-Fermentation (Abbildung 6-32) führte zur Bildung von  $63,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  1,3-Propandiol mit einer molaren Ausbeute von 59,4 %. Die durchschnittliche Produktivität lag bei  $0,71 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ .

Diese Ergebnisse warfen einige Fragen auf, zum Beispiel war abzuklären, wie bedeutsam der Einfluss des Hefeextraktes im Feed der fed-batch-Fermentationen war. Um den Einfluss des fehlenden Hefeextraktes auszuschalten, wurden deshalb



die folgenden batch-Fermentationen unter Zudosage einer konzentrierten Hefeextraktlösung durchgeführt, deren Menge so gewählt wurde, dass die Menge mit der bei fed-batch-Fermentationen zugegebenen Menge übereinstimmte. Durch Variation der Glycerinstartkonzentration wurde versucht, die maximal erreichbare 1,3-Propandiolkonzentration bei batch-Fermentationen zu ermitteln. Es wurde Rohglycerinwasser verwendet, da ein Vergleich der batch-Fermentationen bei der Verwendung von Rohglycerinwasser besseres Ergebnis zeigte.



**Abbildung 6-33:** Vergleich von batch-Fermentationen mit unterschiedlicher Glycerinstartkonzentration (IK 123, MinS<sup>15</sup>N<sup>50</sup>RG, 32 °C, pH 7,0)

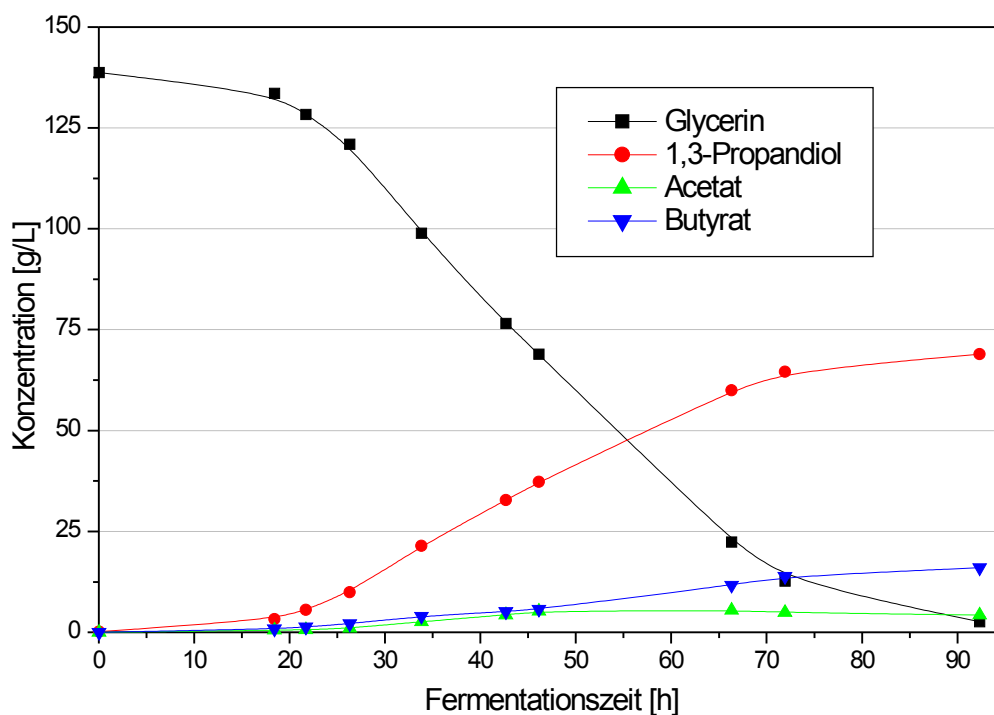
Es zeigte sich (Abbildung 6-33, Tabelle 6-17), dass mit dem Absenken der Startkonzentration an Glycerin ein Ansteigen der Endkonzentration an 1,3-Propandiol erfolgte. Dies führte dazu, dass mit einer Startkonzentration von  $138,6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Glycerin eine Endkonzentration von  $69,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  1,3-Propandiol bei annäherndem Totalumsatz des Glycerins erreicht wurde. Die Produktivität (Tabelle 6-17) stieg beim Absenken der Startkonzentration an Glycerin von  $0,71 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$  auf  $0,75 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$  an. Vergleicht man diese Produktivitäten mit der bei den fed-batch-Fermentationen

(6.4.1, 6.4.2 und 6.4.3), so ist diese deutlich niedriger. Bei den fed-batch-Fermentationen wurden Produktivitäten von bis zu  $1,51 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$  erreicht. Diese doppelt so hohen Produktivitäten und die deutlich höhere 1,3-Propandiol-endkonzentration sprechen eindeutig für eine fed-batch Strategie bei der fermentativen 1,3-Propandiolproduktion mit IK 123. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden deshalb ausschließlich fed-batch-Fermentationen durchgeführt. Die Zudosage von Hefeextrakt führte bei batch-Fermentationen zu keiner Verbesserung des Fermentationsergebnisses, sodass sich sagen lässt, dass der Einfluss der zur Verfügung stehenden Hefeextraktmenge im Verhältnis zum Einfluss der Glycerinstartkonzentration vernachlässigbar ist.

**Tabelle 6-17:** Vergleich von batch-Fermentationen mit unterschiedlicher Glycerinstartkonzentration

Startkonzentration Glycerin [ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ]	138,6	158,8	187,7
erreichte 1,3-Propandiol Endkonzentration [ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ]	69,0	65,6	63,5
molare Ausbeute	61,4	59,7	59,1
Produktivität [ $\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ ]	0,75	0,71	0,71

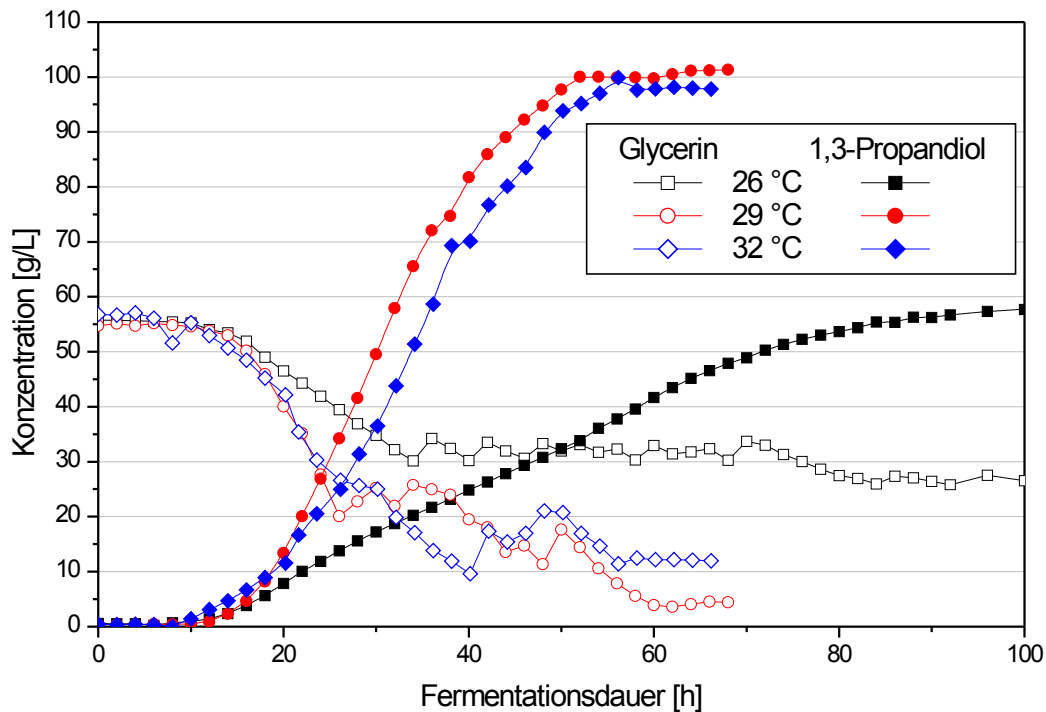
Da es für die Aufarbeitung günstiger ist, wenn die Fermentationsbrühe frei von Glycerin ist, soll hier nochmals näher auf die batch-Fermentation mit Totalumsatz eingegangen werden. Wie aus Abbildung 6-34 hervorgeht, ist bei einer Startkonzentration von  $140 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Glycerin ein Totalumsatz möglich. Dies ist interessant, da dies eine Verwendungsmöglichkeit von sehr niedrig konzentrierten Rohglycerinwässern darstellt.



**Abbildung 6-34:** batch-Fermentation mit IK 123 unter Verwendung von Rohglycerinwasser (MinS<sup>15</sup>N<sup>50</sup>RG<sup>140</sup>, 32 °C, pH 7,0)

#### 6.4.6 Optimierung der Fermentationstemperatur für IK 123

Da die Optimierung der Fermentationstemperatur für den Mikroorganismus IK 96 (Kapitel 6.2.2) zu einer eindeutigen Verbesserung führte, wurde auch für IK 123 eine Untersuchung zum Einfluss der Fermentationstemperatur durchgeführt. Durch die Realisierung des automatischen Fermentersystems mit online-HPLC-Analytik (siehe 4.10.5) war eine genauere Fermentationsführung (bessere Steuerung der Glycerinkonzentration) mit geringerem Personalaufwand möglich geworden.



**Abbildung 6-35:** Vergleich der fed-batch-Fermentationen von IK 123 bei den Temperaturen 26, 29 und 32 °C (MinS<sup>15</sup>N<sup>50</sup>PG, pH 7,0, Feed: 80 %iges Pharmaglycerin mit 40 g · L<sup>-1</sup> Hefeextrakt)

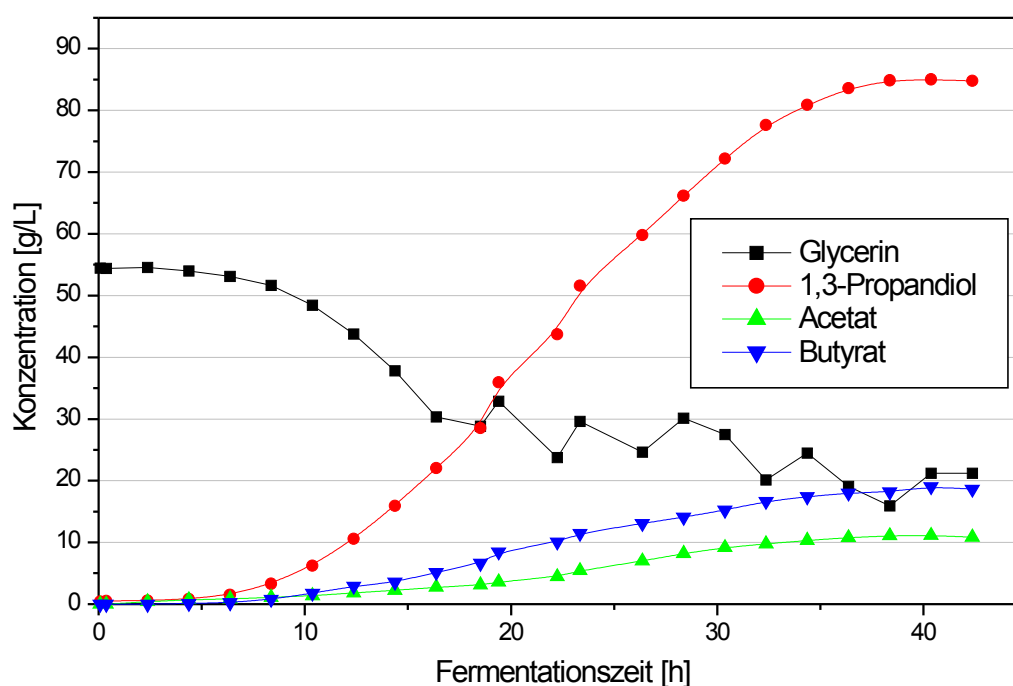
Wie aus Abbildung 6-35 hervorgeht, liegt die optimale Fermentationstemperatur im Bereich von 29 bis 32 °C, wobei die maximale 1,3-Propandiolkonzentration bei beiden Temperaturen bei 101 g · L<sup>-1</sup> liegt. Bei 32 °C ist die lag-Phase etwas geringer, aber bezüglich der maximalen und der durchschnittlichen Produktivität ist kein Unterschied festzustellen. Die durchschnittliche Produktivität lag bei 1,92 g · (L · h)<sup>-1</sup>. Bei 26 °C sind sowohl das Zellwachstum als auch die 1,3-Propandiolbildung sehr verlangsamt, und es wird nur eine maximale 1,3-Propandiolkonzentration von 61,4 g · L<sup>-1</sup> erreicht. Die molare Ausbeute stieg mit zunehmender Temperatur. Betrug sie bei 26 °C noch 59 %, so lag sie bei 29 °C schon bei 63 %, um bei 32 °C auf 68 % zu steigen. Für die weiteren Experimente wurde deshalb eine Temperatur von 32 °C verwendet.

**Tabelle 6-18:** Vergleich der fed-batch-Fermentationen von IK 123 bei unterschiedlichen Temperaturen

Temperatur [°C]	26	29	32
erreichte 1,3-Propandiol Endkonzentration [g · L <sup>-1</sup> ]	61,0	101,3	99,9
molare Ausbeute [%]	59,2	63,4	67,9
Produktivität [g · (L · h) <sup>-1</sup> ]	0,44	1,92	1,78

#### 6.4.7 Fed-batch-Fermentation mit Rohglycerinwasser

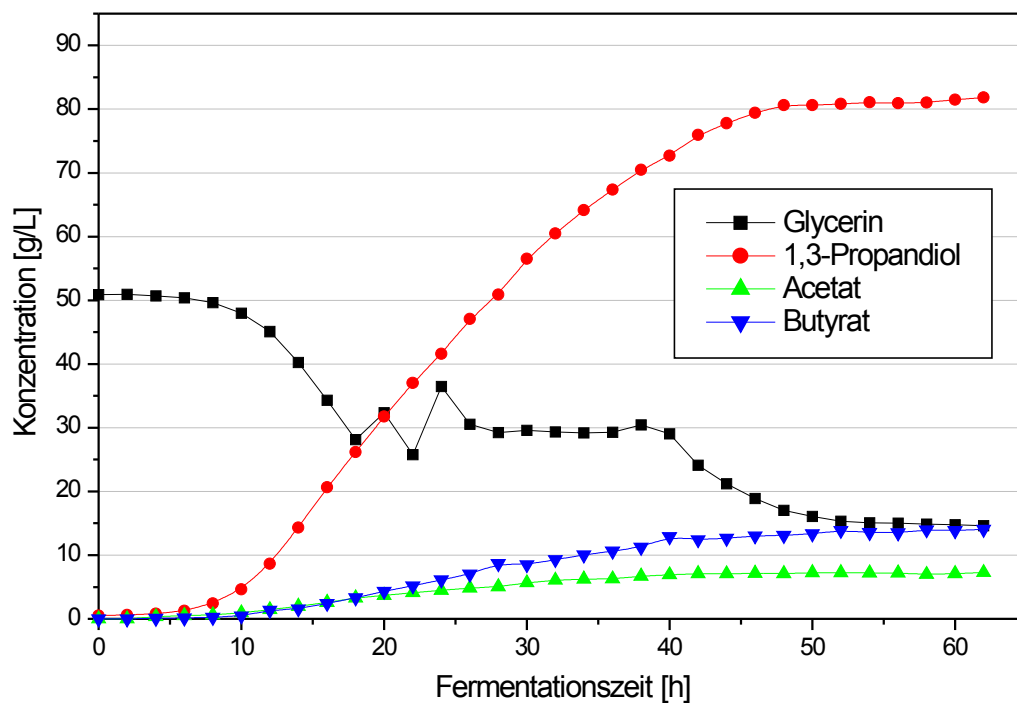
Um Aussagen über die Verwendungsmöglichkeiten von Rohglycerinwässern zu erhalten, wurde eine fed-batch-Fermentation mit Rohglycerinwasser durchgeführt.



**Abbildung 6-36:** Fed-batch-Fermentation mit IK 123 unter Verwendung von Rohglycerinwasser (MinS<sup>15</sup>N<sup>50</sup>RG, 32 °C, pH 7,0, Feed: 80 %iges Rohglycerin mit 40 g · L<sup>-1</sup> Hefeextrakt)

Bei dem verwendeten Rohglycerinwasser handelte es sich um ein Rohglycerinwasser aus einer Fettspaltungsanlage analog zu dem in Kapitel 6.1.3 als CF2 gekennzeichneten Rohglycerinwasser.

Es zeigte sich (Abbildung 6-36), dass es bei der Verwendung von Rohglycerinwasser bei fed-batch-Fermentationen von IK 123 zu einer deutlichen Minderung der erreichbaren 1,3-Propandiolkonzentration kommt. Es wurde nur eine Konzentration von  $85,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  1,3-Propandiol erreicht. Die durchschnittliche Produktivität lag bei  $2,11 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ , und war damit höher als bei der Fermentation mit Pharmaglycerin (siehe 6.4.6). Die molare Ausbeute betrug allerdings nur 63 %. Da das in Kapitel 6.4.6 ermittelte Temperaturoptimum im Bereich von 29 bis 32 °C lag, wurde versucht, durch Absenken der Temperatur auf 29 °C eine verbesserte Umsetzung des Rohglycerinwassers zu erreichen.



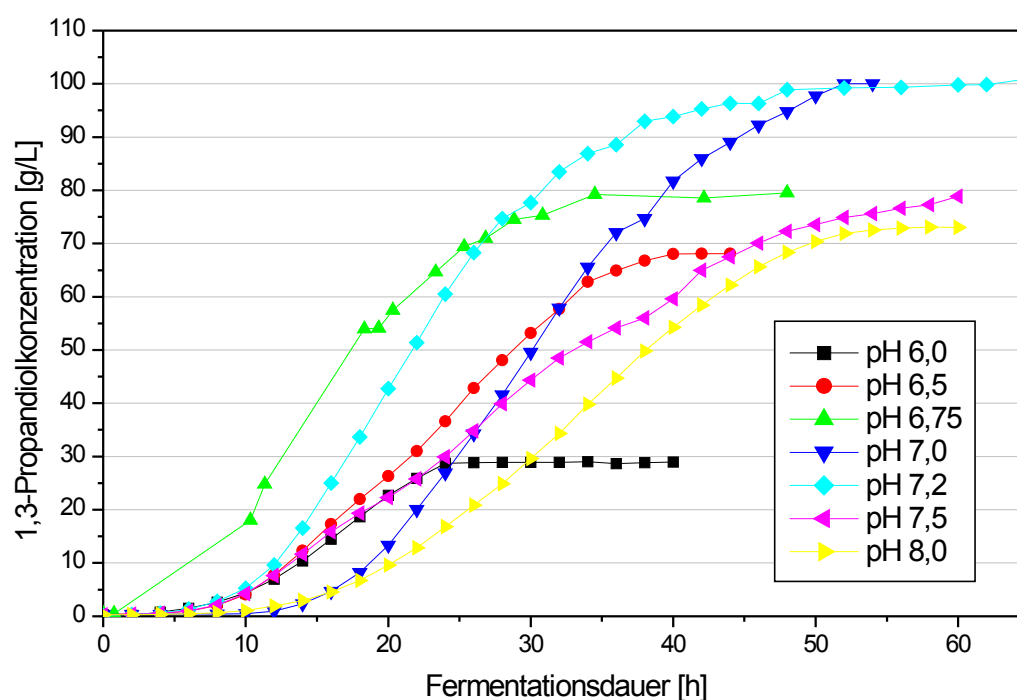
**Abbildung 6-37:** Fed-batch-Fermentation mit IK 123 unter Verwendung von Rohglycerinwasser (MinS<sup>15</sup>N<sup>50</sup>RG, 29 °C, pH 7,0, Feed: 80 %iges Rohglycerin mit  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Hefeextrakt)

Dieses Experiment führte zu keinem Erfolg, die 1,3-Propandiolebdkonzentration sank von  $85,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  bei 32 °C auf  $81,3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  1,3-Propandiol bei 29 °C. Die durch-

schnittliche Produktivität sank ebenfalls auf  $1,50 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ , während keine Auswirkung der Temperatursenkung auf die Ausbeute zu beobachten war.

#### 6.4.8 Optimierung des pH-Wertes der Fermentation IK 123

Analog zur Optimierung der Temperatur wurde auch eine Optimierung des pH-Wertes durchgeführt. Dazu wurden verschiedene pH-Werte im Bereich von 6,0 bis 8,0 getestet. Es wurde das Mineralsalzmedium  $\text{MinS}^{15}\text{N}^{50}$  verwendet, und die Temperatur betrug  $32^\circ\text{C}$ .



**Abbildung 6-38:** Verläufe der 1,3-Propandiolbildung von IK 123 bei unterschiedlichen pH-Werten im Bereich von 6,0 bis 8,0 ( $\text{MinS}^{15}\text{N}^{50}\text{PG}$ ,  $32^\circ\text{C}$ , Feed: 80 %iges Pharmaglycerin mit  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Hefeextrakt)

Betrachtet man das Ergebnis (Abbildung 6-38) dieser Fermentationen, so ist eindeutig ein optimaler pH-Bereich zwischen pH 7,0 und pH 7,2 gegeben. Ein Verlassen dieses optimalen pH-Bereiches führte dagegen schnell zu deutlich schlechteren Ergebnissen. Analysiert man die Zahlenwerte für 1,3-Propandiolendkonzentration, Produktivität und molare Ausbeute (Tabelle 6-19), so stellt man

fest, dass ein pH-Wert von 7,2 vorzuziehen ist. Es sind nicht nur molare Ausbeute und Produktivität höher, sondern auch die Toleranz des Systems im Bezug auf regelungsbedingte Schwankungen des pH-Wertes ist besser, da die Fermentation offensichtlich deutlich anfälliger auf niedrige als auf hohe pH-Werte reagiert.

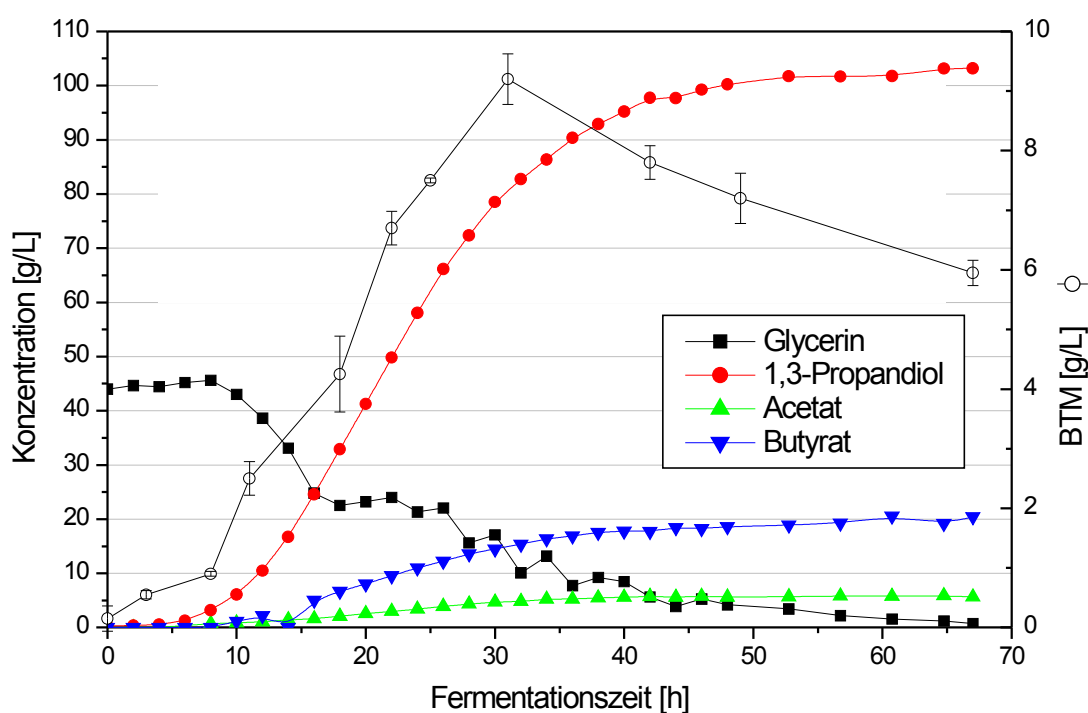
**Tabelle 6-19:** 1,3-Propandiolendkonzentration, molare Ausbeute und Produktivität von IK 123 in Abhängigkeit vom pH-Wert

pH-Wert	6,0	6,5	6,75	7,0	7,2	7,5	8,0
erreichte 1,3-Propandiol Endkonzentration [g · L <sup>-1</sup> ]	29,0	68,1	79,5	100,0	101,0	78,9	73,0
molare Ausbeute	74,6	80,9	77,4	78,6	86,2	80,9	79,4
Produktivität [g · (L · h) <sup>-1</sup> ]	0,96	1,70	1,65	1,92	1,98	1,30	1,26

#### 6.4.9 Optimale Biokonversion von Glycerin zu 1,3-Propandiol mit IK 123

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der vorangegangenen Experimente bezüglich Temperatur (siehe 6.4.6), pH-Wert (siehe 6.4.8), Medienzusammensetzung (siehe 6.4.2) und Glycerinstartkonzentration (siehe 6.3.3.1 und 6.3.4) wurde eine Fermentation mit den jeweils optimalen Parametern durchgeführt. Betrachtet man das Resultat (Abbildung 6-39), so stellt man fest, dass mit diesen optimalen Bedingungen eine 1,3-Propandiolkonzentration am Fermentationsende von 103,19 g · L<sup>-1</sup> erreicht werden kann. Es wurde eine durchschnittliche Produktivität von 1,92 g · (L · h)<sup>-1</sup> mit einer molaren Ausbeute von 71,4 % erzielt. Vergleicht man diese Werte, vor allem die 1,3-Propandiolendkonzentration, mit den zu Beginn der Arbeit erzielten Ergebnissen mit *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 (Kapitel 6.1.4) von 53,5 g · L<sup>-1</sup> 1,3-Propandiol als Endkonzentration bei einer Produktivität von 0,67 g · (L · h)<sup>-1</sup> und einer molaren Ausbeute von 60,0 %, so ist die Endkonzentration an 1,3-Propandiol um fast 50 g · L<sup>-1</sup> gesteigert worden. Die Produktivität des Biokonversionsprozesses konnte um 1,25 g · (L · h)<sup>-1</sup> gesteigert werden, die molare Ausbeute verbesserte sich um 11,4 %.



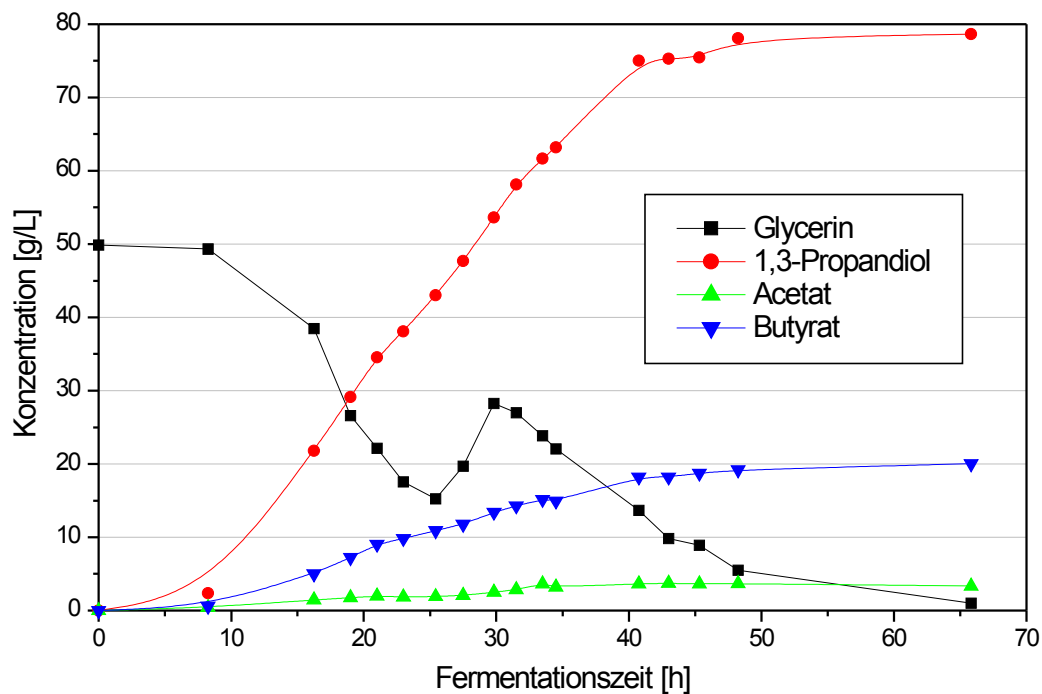


**Abbildung 6-39:** Optimale Biokonversion mit IK 123 (MinS<sup>15</sup>N<sup>50</sup>PG, 30 °C, pH 7,2, Feed: 80 %iges Pharmaglycerin mit 40 g · L<sup>-1</sup> Hefeextrakt)

#### 6.4.10 Fermentationen im 10 Liter Maßstab

Das Scale-up für IK 123 (Abbildung 6-40) verlief im Gegensatz zum Scale-up bei IK-96 ohne größere Probleme, obwohl die Optimierung bezüglich des pH-Wertes noch nicht erfolgt war. Es wurde auf Anhieb eine 1,3-Propandiolkonzentration von 78,6 g · L<sup>-1</sup> am Ende der Fermentation erreicht. Die durchschnittliche Produktivität betrug 1,62 g · (L · h)<sup>-1</sup>. Die molare Ausbeute lag bei 0,62, damit in einer mit *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 vergleichbaren Größenordnung. Bei der Biokonversion im 10 Litermaßstab zeigte sich der Stamm IK 123 dem *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 somit überlegen. Es wurde in kürzerer Zeit eine höhere 1,3-Propandiolkonzentration erreicht. Dass die im 1 Liter Maßstab erreichte Endkonzentration von über 100 g · L<sup>-1</sup> nicht erreicht werden konnte, mag auch an den Unterschieden der verwendeten Fermenter liegen. Beim 1 Liter Fermenter handelte es sich um einen Glasfermenter mit einem Magnetrührkern zur Durchmischung (siehe 4.10.1). Bei dem für die Fermentationen im 10 Liter Maßstab

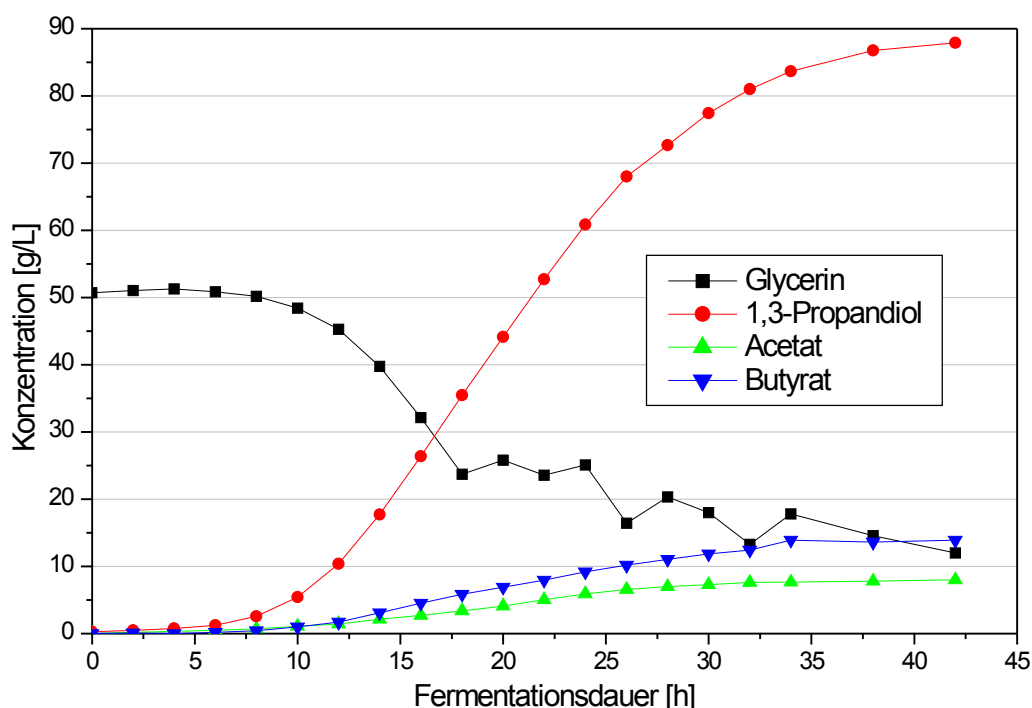
verwendeten Fermenter handelte es sich um einen Edelstahlfermenter mit zwei Scheibenrührern. Während im 1 Liter Maßstab die Natronlauge zur pH-Wert-Korrektur über eine Kapillare direkt ins Medium eingeleitet wird, wird im 10 Liter Maßstab die Natronlauge von oben auf das Medium gegeben, während der pH-Wert im unteren Teil des Fermenters gemessen wird. Dies kann zur Ausbildung eines pH-Gradienten innerhalb des Fermenters geführt haben, sodass nur in einem Teil des Fermentationsmediums der pH-Wert beim Sollwert gelegen haben dürfte. Weitere bauliche Unterschiede der Fermenter sorgten für deutliche Unterschiede bei Durchmischung, auftretenden Scherkräften und dem Gasaustausch, wodurch sich das schlechtere Ergebnis im 10 Liter Maßstab erklären lässt.



**Abbildung 6-40:** Fed-batch-Fermentation mit IK 123 im 10 Liter Maßstab  
(MinS<sup>15</sup>N<sup>50</sup>PG, 32 °C, pH 7,0, Feed: 80 %iges Pharmaglycerin mit 40 g · L<sup>-1</sup>  
Hefeextrakt)

## 6.5 Aufreinigung von Rohglycerin

Da die Verwendung von Rohglycerinwässern zu einer Verschlechterung des Biokonversionsprozesses führt, wurde begonnen, die Auswirkungen einfacher Reinigungsschritte auf die Verwertbarkeit des Rohglycerinwassers zu testen. Die behandelten Rohglycerinwässer wurden im 1 Liter Fermenter (IK 123, MinS<sup>15</sup>N<sup>50</sup>, pH 7,0, 32 °C) eingesetzt, und die Resultate des Versuchs mit denen des nichtbehandelten Rohglycerinwassers (Abbildung 6-41) verglichen.



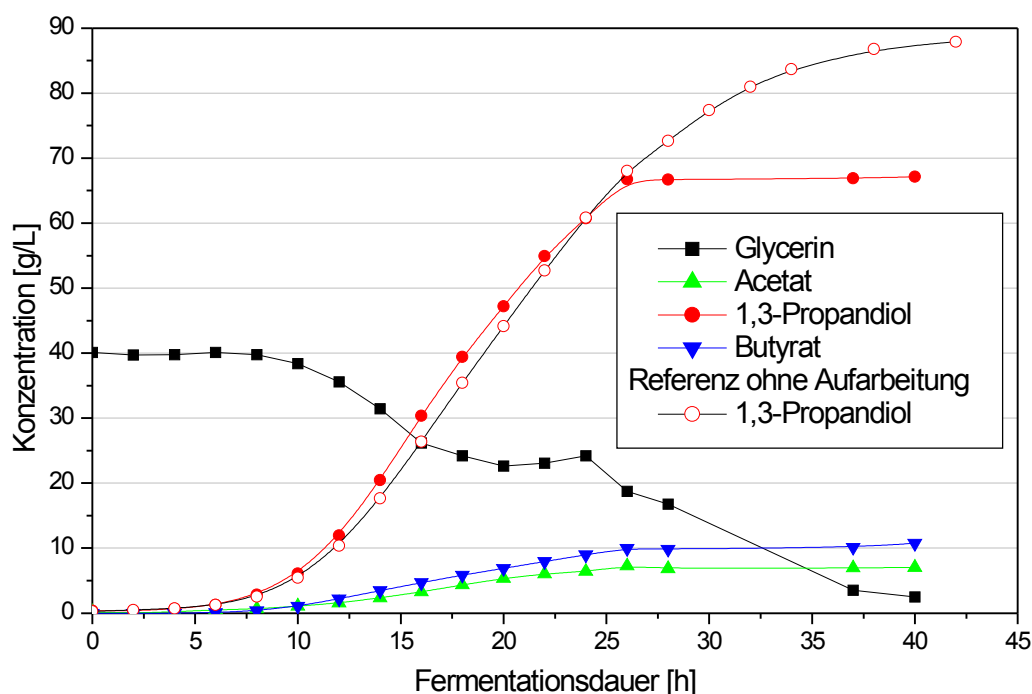
**Abbildung 6-41:** Fed-batch-Fermentation mit Rohglycerinwasser (IK 123, MinS<sup>15</sup>N<sup>50</sup>RG, 32 °C, pH 7,0, Feed: 80 %iges Rohglycerin mit 40 g · L<sup>-1</sup> Hefeextrakt)

Mit dem nicht behandelten Rohglycerinwasser wurde in 42 Stunden eine 1,3-Propandiolkonzentration von 87,9 g · L<sup>-1</sup> erreicht, das entspricht einer durchschnittlichen Produktivität von 2,09 g · (L · h)<sup>-1</sup>. Die molare Ausbeute bei dieser Fermentation betrug 74,2 %. Dies ist interessant, da die Ausbeute über der in der Literatur (ZENG, 1996) theoretisch maximal möglichen Ausbeute liegt. Dies lässt sich auf die Nutzung von im Rohglycerinwasser enthaltenen Co-Substraten zurückführen.

Vergleich man diese Ergebnisse mit denen, die mit Pharmaglycerin erreicht wurden, so zeigt sich, dass die Endkonzentration an 1,3-Propandiol bei Fermentationen mit dem verwendeten Rohglycerin niedriger ist, während Produktivität und molare Ausbeute leicht gesteigert werden.

### 6.5.1 Biodiesel

Da ein großer Teil der in Frage kommenden Rohglycerinwässer bei der Biodieselproduktion anfallen, und so bei diesen Anlagen Biodiesel jederzeit verfügbar ist, wurde untersucht, ob sich durch die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Biodiesel schädliche Komponenten aus dem Rohglycerinwasser entfernen lassen. Das Ergebnis dieser Aufarbeitung ist in Abbildung 6-42 dargestellt. Nachdem die Biokonversion die ersten 25 Stunden parallel zu der mit unbehandeltem Rohglycerinwasser lief, fand in diesem Experiment nach 25 Stunden keine 1,3-Propandiolbildung mehr statt.

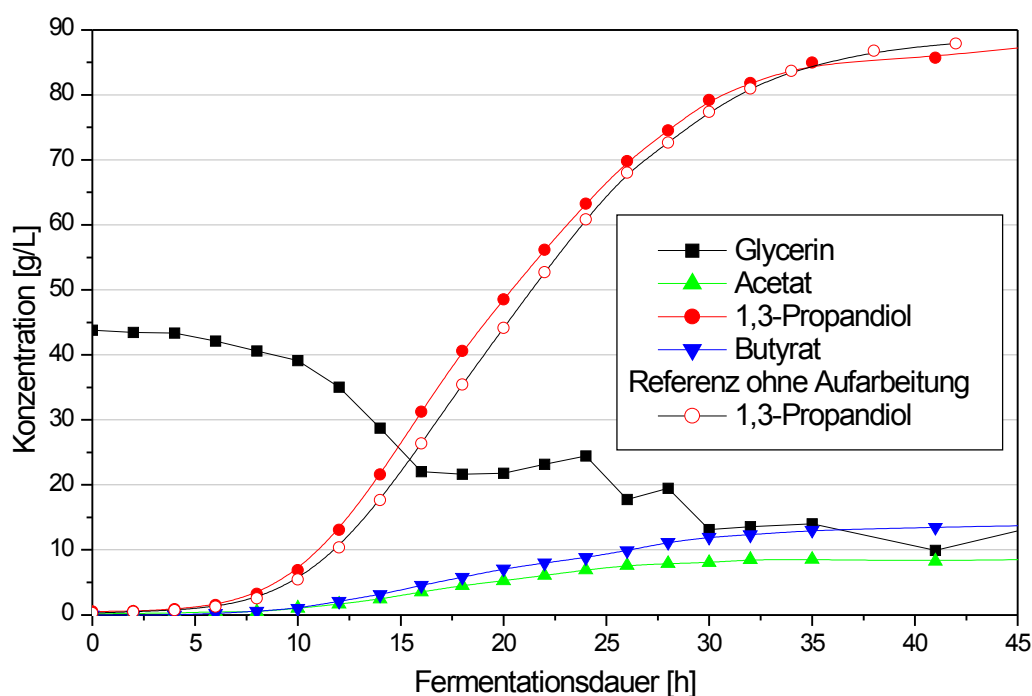


**Abbildung 6-42:** Fed-batch-Fermentation mit Rohglycerinwasser nach Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Biodiesel (IK 123, MinS<sup>15</sup>N<sup>50</sup>RG, 32 °C, pH 7,0, Feed: 80 %iges Rohglycerin mit 40 g · L<sup>-1</sup> Hefeextrakt)

Es wurde aber das restliche Glycerin verbraucht. Dadurch fiel die Ausbeute auf unter 59 % ab. Nach diesem Ergebnis kann die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Biodiesel als geeignete Aufreinigungsmethode ausgeschlossen werden.

### 6.5.2 Rapsöl

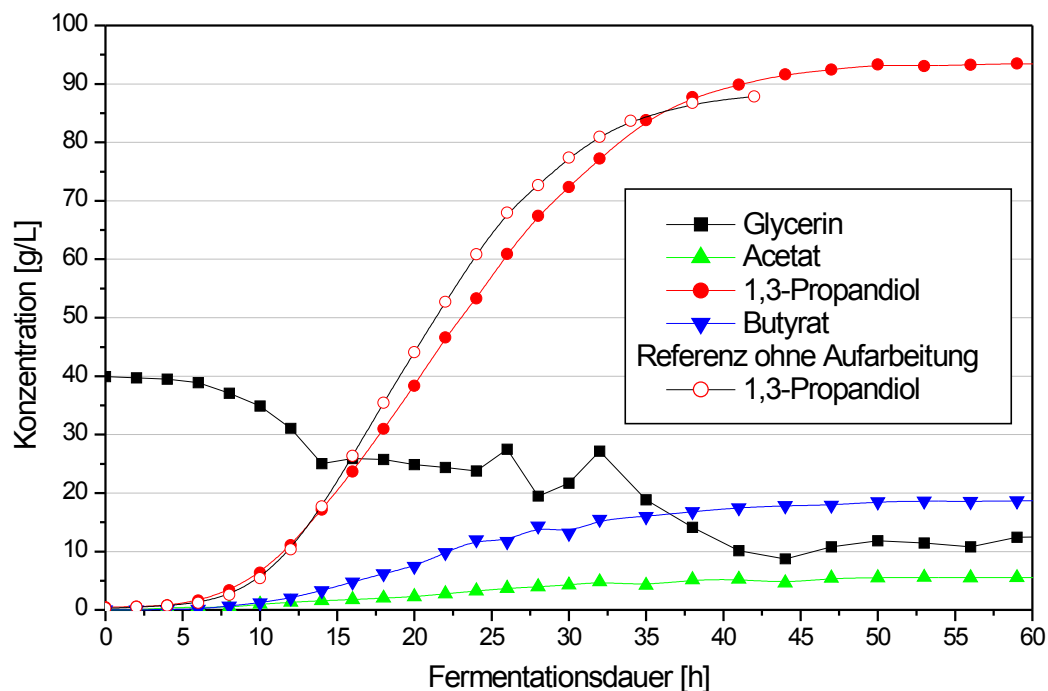
Analog zur Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Biodiesel wurde auch eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Rapsöl untersucht. Wie aus Abbildung 6-43 hervorgeht, erbrachte die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Rapsöl keine Veränderung bei der Biokonversion.



**Abbildung 6-43:** Fed-batch-Fermentation mit Rohglycerinwasser nach Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Rapsöl (IK 123, MinS<sup>15</sup>N<sup>50</sup>RG, 32 °C, pH 7,0, Feed: 80 %iges Rohglycerin mit 40 g · L<sup>-1</sup> Hefeextrakt)

### 6.5.3 Anionentauscher

Die Aufreinigung durch Ionentauscher ist ein ebenfalls weitverbreitetes Verfahren zur Abtrennung von ungewollten Inhaltsstoffen. Hier wurde die Aufreinigung mittels des Anionentauschers Lewatit M 500 (Bayer, Leverkusen) durchgeführt. Das resultierende aufgereinigte Rohglycerinwasser wurde wie bereits in den vorangegangenen Experimenten bei der Biokonversion verwendet. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 6-44 zu sehen. Es zeigte sich, dass das mittels Anionentauscher aufgereinigte Rohglycerinwasser zu einer Steigerung der Endkonzentration an 1,3-Propandiol auf  $95,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  führte. Dies ist eine Steigerung von  $7,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ . Neben dieser Steigerung der Endkonzentration trat aber eine Verlangsamung des Konversionsprozesses auf. Die durchschnittliche Produktivität lag bei  $1,86 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ , also um  $0,23 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$  unter dem Wert bei nicht behandeltem Rohglycerinwasser.

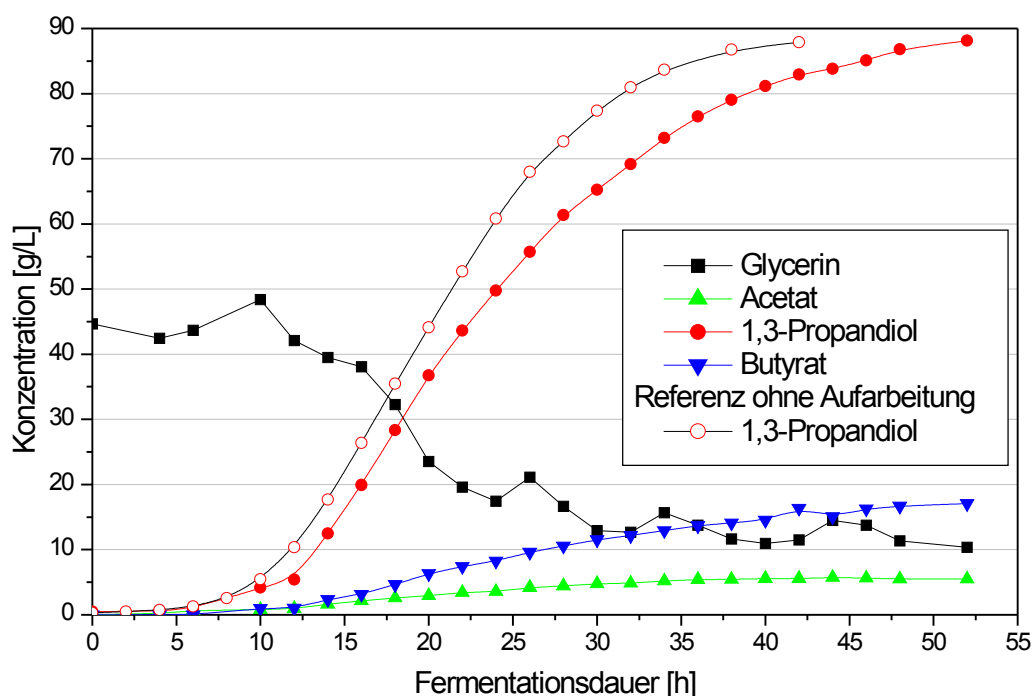


**Abbildung 6-44:** Fed-batch-Fermentation mit Rohglycerinwasser nach der Aufarbeitung mit einem Anionentauscher (IK 123, MinS<sup>15</sup>N<sup>50</sup>RG, 32 °C, pH 7,0, Feed: 80 %iges Rohglycerin mit  $40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Hefeextrakt)

Die molare Ausbeute entsprach mit 74,1 % dem Wert bei nichtbehandeltem Rohglycerinwasser. Auch hier sei wieder auf die schon in Kapitel 3.1.1.2 erwähnte theoretisch maximal mögliche molare Ausbeute von 72 % hingewiesen, die hier überschritten wird. Dies dürfte wie schon in Kapitel 6.5 diskutiert auf im Rohglycerinwasser enthaltene Co-Substrate zurückzuführen sein.

#### 6.5.4 Anionen- und Kationentauscher

Nachdem die Aufreinigung mit dem Anionentauscher eine Verbesserung gebracht hatte, wurde untersucht, ob eine nachgeschaltete zweite Reinigungsstufe mit einem Kationentauscher zu einer weiteren Verbesserung des Biokonversionsergebnisses führt. Dazu wurde das mit dem Anionentauscher (Lewatit M 500, Bayer, Leverkusen) behandelte Rohglycerinwasser in einem zweiten Schritt mit einem Kationentauscher (Lewatit SP-108, Bayer, Leverkusen) behandelt.



**Abbildung 6-45:** Fed-batch-Fermentation mit Rohglycerinwasser nach der Aufarbeitung mit einem Anionentauscher und einem Kationentauscher (IK 123, MinS<sup>15</sup>N<sup>50</sup>RG, 32 °C, pH 7,0, Feed: 80 %iges Rohglycerin mit 40 g · L<sup>-1</sup> Hefeextrakt)

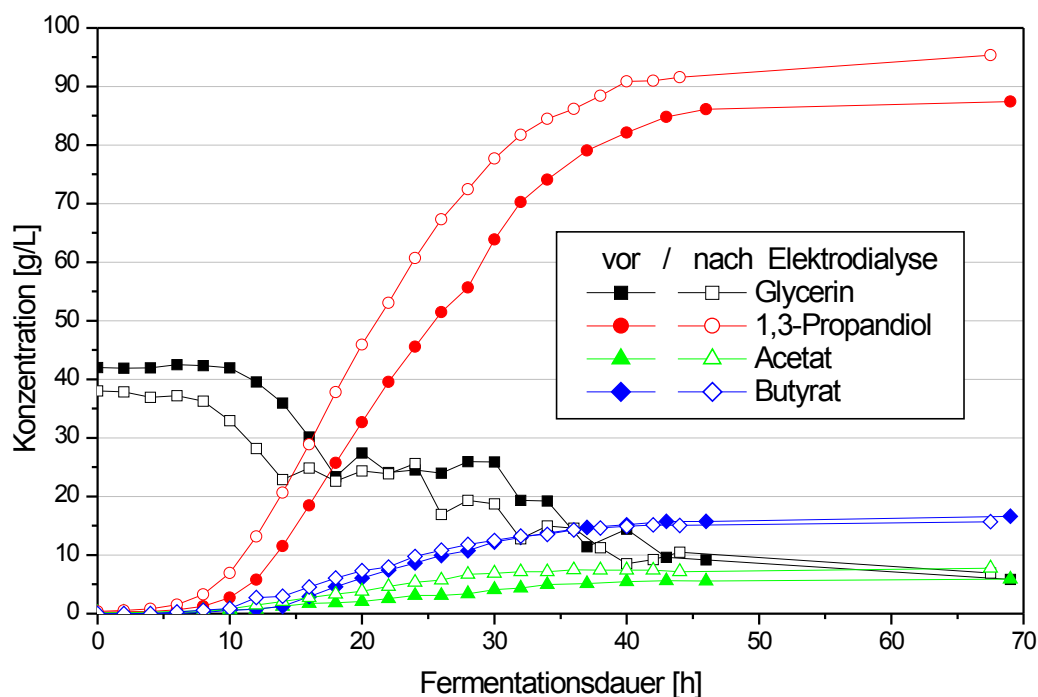
Abbildung 6-45 zeigt das Ergebnis dieses Versuches. Im Gegensatz zum einfachen Aufreinigungsschritt mit dem Anionentauscher wurde durch die Verwendung von An- und Kationentauscher keine Verbesserung erzielt. Die Endkonzentration an 1,3-Propandiol lag um  $0,1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  höher als beim unbehandelten Rohglycerinwasser. Dafür sank die durchschnittliche Produktivität um  $0,4 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$  auf  $1,69 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ . Vergleicht man diese Werte mit denen der Fermentation mit nur mit dem Anionentauscher behandelten Rohglycerinwasser, so zeigt sich, dass der zweite Aufarbeitungsschritt zwar zu einer gesteigerten Produktivität führt, dafür aber zu einem Absinken der Endkonzentration an 1,3-Propandiol. Die Ursache hierfür liegt im Entziehen von wachstumsfördernden Inhaltsstoffen durch den Kationentauscher, dessen Verwendung bei der Aufreinigung zu einer deutlichen Verringerung der essentiellen Spurenelemente führt.

#### 6.5.5 Elektrodialyse

Ein weiteres Experiment zur Aufreinigung von Rohglycerinwässern waren die Untersuchungen zur Aufreinigung durch Elektrodialyse. Sie wurden mit Rohglycerinwasser-Proben der Firma Mega (Stráž pod Ralskem, CZ) durchgeführt. Es wurde ein durch Elektrodialyse aufgereinigtes Rohglycerinwasser mit dem Rohglycerinwasser vor Aufreinigung verglichen. Dazu wurden beide Chargen (Analysen siehe Tabelle 6-20) einer Biokonversion mit dem Mikroorganismus IK 123 unterzogen und die Ergebnisse ausgewertet. Abbildung 6-46 zeigt deutlich den positiven Einfluss der Elektrodialyse des Rohglycerinwassers auf die Biokonversion. Die Endkonzentration an 1,3-Propandiol steigt von  $87,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  ohne auf  $95,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  mit Elektrodialyse. Die durchschnittliche Produktivität steigt von  $2,05 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$  auf  $2,27 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$  an, wenn das Rohglycerinwasser vor der Biokonversion einer Elektrodialyse unterworfen wird. Die molare Ausbeute lässt sich durch die Elektrodialyse ebenfalls von 65,6 % auf 74,4 % steigern. Dies lässt sich durch das geänderte Nebenproduktspektrum und das Vorhandensein von als Co-Substraten nutzbaren Inhaltsstoffen im Rohglycerinwasser erklären. Beim Experiment mit dem dialysierten Rohglycerinwasser wird deutlich mehr Acetat gebildet, während die Bildung von Butyrat abnimmt.



Dass diese Stoffwechseländerung positive Auswirkungen auf die Ausbeute hat, da bei der Bildung von Acetat im Gegensatz zum Butyrat kein  $\text{NADH}_2$  verbraucht wird (Abbildung 3-2), ist schon in der Literatur (ZENG 1996) ausgiebig diskutiert worden und soll an dieser Stelle deshalb nicht näher erläutert werden (siehe auch 3.1.1.2).



**Abbildung 6-46:** Vergleich der Fermentationen mit Rohglycerinwasser vor und nach der Elektrodialyse (IK 123, MinS<sup>15</sup>N<sup>50</sup>RG, 31 °C, pH 7,0, Feed: 80 %iges Rohglycerin mit 40 g · L<sup>-1</sup> Hefeextrakt)

**Tabelle 6-20:** Konzentrationen verschiedener Elemente bei den Rohglycerinwässern (Mega, Stráž pod Ralskem, CZ) vor / nach der Elektrodialyse

	vor Elektrodialyse	nach Elektrodialyse
Glycerin [ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ]	1006,2	740,7
Element	[ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ]	[ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ]
B	0,29	0,28
Mg	28,88	24,06
Al	9,17	10,53
P	2065,99	833,79
Ca	57,67	33,93
Cr	0,46	0,15
Mn	0,32	0,36
Fe	6,96	4,91
Co	0,01	0,01
Ni	0,44	0,42
Cu	4,16	5,45
Zn	0,81	0,58
Mo	0,04	0,02
Cd	0,01	0,01
Pb	0,45	0,74

## 7 Zusammenfassung und Ausblick

### 7.1 Immobilisierung in LentiKats®

Die reproduzierbare Herstellung von Immobilisaten ist eine wesentliche Voraussetzung zur technischen Nutzbarkeit von Immobilisaten. Während in bisherigen Arbeiten der Einfluss der Immobilisierungsparameter Trocknungsdauer, Trocknungsgrad und die Art des Rückquellens bei der Immobilisierung in LentiKats® untersucht wurden, wurde in dieser Arbeit auf den Einfluss des Kulturalters auf die Überlebensrate untersucht. Es zeigte sich, dass die bisherige Ausrichtung auf eine Immobilisierung in der exponentiellen Wachstumsphase von *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 nicht optimal ist. Da am Ende der exponentiellen Wachstumsphase eine Phase mit extrem niedriger Überlebensrate folgt, besteht bei einer Immobilisierung in der exponentiellen Wachstumsphase die Möglichkeit in diese Phase mit schlechter Überlebensrate zu kommen. Es ist daher besser ein höheres Kulturalter abzuwarten und die Sporen zu immobilisieren. Die Immobilisierung von Sporen vereint dabei die Vorteile einer hohen Zellzahl, in diesem Fall Sporenzahl, mit einer sehr hohen Überlebensrate und ist zusätzlich noch sehr unkritisch, was den exakten Immobilisierungszeitpunkt angeht.

### 7.2 Automatisierung eines Laborfermentersystems

Die Verwendung eines möglichst vollständig automatisierten Fermentersystems mit online-Analytik stellt eine wesentliche Voraussetzung zur Durchführung umfassender Forschungen auf dem Gebiet der Fermentationsoptimierung dar. Ohne weitgehend automatisch ablaufende Fermentationen wäre eine Durchführung ausgiebiger Untersuchungen personell nicht mehr machbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein automatisch arbeitendes Laborfermentersystem realisiert, das aus kostengünstigen Einzelkomponenten aufgebaut und flexibel einsetzbar ist. Es wurde gezeigt, dass durch geschickte Auswahl von Komponenten und die Nutzung moderner Computerhardware der Bau von automatisierten Fermentersystemen problemlos

möglich ist. Als Weiterentwicklung wäre noch die Erweiterung des Systems auf mehrere Fermenter denkbar, die ähnlich dem in Kapitel 4.10.4 vorgestellten 1-Liter-Doppelfermentersystems ein gleichzeitiges Testen mehrerer Parameter erlauben würden. Die Anzahl der Fermenter würde dabei nur durch die Leistungsfähigkeit der online-Analytik bestimmt, deren Messdauer der limitierende Faktor wäre.

### 7.3 Mikrobielle 1,3-Propandiol-Produktion

Die mikrobielle Produktion von 1,3-Propandiol aus Glycerin wurde am Beispiel von drei unterschiedlichen Stämmen untersucht, von denen zwei erstmalig im Rahmen dieser Arbeit getestet wurden. Es konnte am Beispiel von *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 gezeigt werden, dass eine Adaption von 1,3-Propandiolbildnern an höhere Produktkonzentrationen möglich ist. Durch die Adaption konnte sowohl die Produktivität als auch die erreichte Endkonzentration an 1,3-Propandiol gesteigert werden. Bei der Endkonzentration ließ sich durch Adaption eine Steigerung um 34 % erreichen, was zeigt, dass durch gezielte Zellkulturführung eine deutliche Verbesserung der eingesetzten Mikroorganismen erreichbar ist. Ein Vergleich dieser Fermentation mit in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen (Tabelle 7-1) zeigt, dass bisher mit keinem *Clostridium butyricum* Stamm eine solch hohe Endkonzentration an 1,3-Propandiol erreicht wurde. Lediglich mit dem Stamm *Klebsiella pneumoniae* wurden bisher bessere Ergebnisse veröffentlicht.

Am Beispiel des Stammes IK 124 ließ sich der Nachweis erbringen, dass beim Scale-up in größere Maßstäbe keine größeren Probleme existieren. Der Stamm IK 124 zeigte außerdem die Fähigkeit zum Erreichen von 1,3-Propandiol Endkonzentrationen von über  $84 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  und ein gutes Wachstumsverhalten auf Rohglycerin.

Die besten Resultate im Rahmen dieser Arbeit wurden mit dem Stamm IK 123 erzielt, der die höchste 1,3-Propandiol Endkonzentration, die beste Ausbeute und die höchste Produktivität erreichte. Wie aus Tabelle 7-1 hervorgeht, wurden bisher keine Ergebnisse eines natürlichen Stammes mit höherer 1,3-Propandiol Endkonzentration publiziert. Lediglich der gentechnisch veränderte Stamm im Patent WO 01/12833A2 erzielt einen besseren Wert.

**Tabelle 7-1:** Vergleich der veröffentlichten Ergebnisse zur 1,3-Propandiol-bildung mit eigenen Resultaten.

Organismus, Quelle	Typ	S / I	$C_{PD}$ [g·L <sup>-1</sup> ]	$Y'_{PD}$ [kg·kg <sup>-1</sup> ]	$P_{PD}$ [g·(L·h) <sup>-1</sup> ]
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>					
HELD 1996	<i>fed-batch</i>	S	72,8	0,40	2,5
ZENG 2001	<i>fed-batch</i>	S	86	k.A.	k.A.
<b><i>Citrobacter freundii</i></b>					
PFLUGMACHER und GOTTSCHALK 1994	Konti	I	16,4	0,47	8,2
<b><i>Clostridium butyricum</i></b>					
GÜNZEL <i>et al.</i> 1991	<i>fed-batch</i>	S	58,0	0,60	2,7
BIEBL <i>et al.</i> 1992	<i>batch</i>	S	56,0	k.A.	1,9
SAINT-AMANS <i>et al.</i> 1994	<i>fed-batch</i>	S	65	0,47	1,2
PETITDEMANGE <i>et al.</i> 1995	<i>fed-batch</i>	S	65,6	0,54	1,4
ABBAD-ANDALOUSSI <i>et al.</i> 1995	<i>fed-batch</i>	S	70,6	0,54	0,8
HIMMI <i>et al.</i> 1999	<i>batch</i>	S	65,4	0,54	1,7
WITTLICH 2001	<i>fed-batch</i>	I	48,5	0,50	2,1
<b>Im Rahmen dieser Arbeit</b>					
NRRL B-1024	<i>fed-batch</i>	S	71,6	0,50	1,19
IK 124	<i>fed-batch</i>	S	84,1	0,51	1,19
IK 123	<i>fed-batch</i>	S	103,1	0,59	1,92
WO 01/12833A2 Patent 2001	<i>fed-batch</i>	S	129	0,34 <sup>**) </sup>	1,7

S: suspendierte, I: immobilisierte Zellen,

<sup>\*)</sup> Die Produktivität von batch bzw. fed-batch Prozessen ist bei jedem Autor unterschiedlich definiert, so dass die Werte nicht direkt vergleichbar sind. <sup>\*\*)</sup>  Ausbeute bezogen auf Glucose

Anhand der Experimente mit IK 123 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der Einsatz von Co-Substraten eine Möglichkeit darstellt, die Ausbeute des Konversionsprozesses zu erhöhen. Dies könnte ein wichtiger Schritt auf dem Weg zu einem profitablen biotechnologischen Verfahren zur Herstellung von 1,3-Propandiol sein. Der in der Literatur behandelte Ersatz von Hefeextrakt durch Biotin und p-Aminobenzoesäure (SAINT-AMANS *et al.* 1994) konnte leider aus zeitlichen Gründen nicht mehr untersucht werden. Sollte es aber möglich sein, den Hefeextrakt durch kostengünstigere Vitaminquellen zu ersetzen, so dürfte sich auch dadurch eine Kostensenkung für die biotechnologische 1,3-Propandiolproduktion ergeben.

## 7.4 Verwendung von Rohglycerin

Die Verwendbarkeit unterschiedlicher Rohglycerinwässer wurde unter Verwendung des Modell Organismus *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 getestet. Ziel war es, Erkenntnisse über die Nutzbarkeit unterschiedlicher Rohglycerinwasserquellen zu erhalten. Das Ergebnis dieser Experimente zeigt deutlich, dass die biotechnologische Verwertbarkeit stark vom Prozess abhängt. Rohglycerinwässer aus Verseifungsanlagen ließen sich nur aufgereinigt verwenden, während bei Rohglycerinwässern aus Fettspaltungsanlagen nur geringe Unterschiede zur Verwendung von Glycerin in Pharmaqualität auftraten. Bei Rohglycerinwässern aus Umesterungsanlagen hängt die Verwertbarkeit vom verwendeten Prozess ab. Während Rohglycerinwässer aus CD-Prozessen gut geeignet sind, führte der Einsatz von Rohglycerinwässern aus Anlagen nach Vogel&Noot oder Feld+Hahn zu deutlich schlechteren Ergebnissen. Die Ursache hierfür ist in den verwendeten Prozesschemikalien zu suchen, die teilweise in nicht unerheblichen Mengen in den Rohglycerinwässern zu finden sind. Als Beispiele seien hier nur Methanol und die teilweise sehr hohen Salzgehalte genannt.

Da die Ergebnisse der Fermentationen mit Rohglycerin hinter den Resultaten mit Glycerin in Pharmaqualität zurückstanden, wurden Experimente zur Aufreinigung des Rohglycerins durchgeführt. Es wurden Flüssig-Flüssig-Extraktionen mit Biodiesel und Rapsöl, An- und Kationentauscher sowie die Aufreinigung mittels Elektrodialyse untersucht. Die Flüssig-Flüssig-Extraktionen führten zu keiner Verbesserung des Fermentationsergebnisses, bei Verwendung von Biodiesel trat sogar eine deutliche Verschlechterung im Fermentationsverlauf auf. Die Aufreinigung mit einem Anionentauscher führte zu einem Anstieg bei der 1,3-Propandiolendkonzentration, der aber mit einer Verringerung der Produktivität einherging. Die Kombination von Kat- und Anionentauscher führte ebenfalls zu einer deutlichen Verschlechterung der Produktivität. Die Elektrodialyse lieferte von allen getesteten Verfahren das beste Ergebnis. Die Endkonzentration an 1,3-Propandiol wurde durch die Elektrodialyse um 9 % gesteigert, die Produktivität stieg sogar um über 10 %. Eine Aufreinigung von Rohglycerinwässern mit Elektrodialyse führt also zu einer verbesserten Eignung für

die Biokonversion. Dieses Ergebnis ist auch aus technischer Sicht positiv zu bewerten, da die Elektrodialyse als kontinuierliches Verfahren problemlos in bestehende Anlagen integrierbar ist.

Es konnte nachgewiesen werden, dass der Einsatz von Rohglycerinwässern zur Biokonversion machbar ist. Die Verwendbarkeit der Rohglycerinwässer kann durch einfache Aufreinigungsschritte verbessert werden. Damit steht dem Einsatz kostengünstiger Rohglycerinwässer zur Biokonversion nichts mehr im Wege. Einzig die Fermentationsstrategie der fed-batch-Fermentation, die sich als die effektivste herausgestellt hat, stellt ein Manko dar. Ungefähr 75 % des eingesetzten Glycerins werden bei der fed-batch-Fermentation in Form von höher konzentriertem Rohglycerinwasser benötigt. Für dieses muss aber ein deutlich höherer Rohstoffpreis angesetzt werden, sodass die Kostenersparnis durch den Einsatz von Rohglycerinwässern nicht sehr hoch ausfällt. Kann man beim Einsatz von niedrig konzentrierten Rohglycerinwässern aus der Fettspaltung noch mit Kostenersparnissen von ca. 50 % gegenüber dem Rohglycerinpreis rechnen, so reduziert sich dieses Einsparpotential beim Einsatz von Rohglycerinwässern aus der Umesterung auf ca. 35 %. Ob dies ausreicht, um einen rentablen Biokonversionsprozess zu ermöglichen, müssen weitergehende Berechnungen zeigen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt wurden. Es haben sich aber viele Ansätze zur Verbesserung des Konversionsprozesses ergeben, die weitere Untersuchungen nötig machen. So ist zum Beispiel der Einsatz von Zuckern zur Steigerung der Ausbeute noch nicht fermentativ untersucht worden und der Stamm IK 124 noch nicht weitergehenden Optimierungsexperimenten unterworfen worden. Auch der Einsatz von Immobilisaten der Stämme IK 123 und IK 124 ist noch nicht näher untersucht worden, sodass auch in diesem Bereich deutliche Verbesserungen bezüglich der Produktivität erwartet werden können.





## 8 Literatur

- ABBAD-ANDALOUSSI S, MANGINOT-DÜRR C, AMINE J, PETITDEMANGE E, PETITDEMANGE H. 1995. Isolation and characterization of *Clostridium butyricum* DSM 5431 mutants with increased resistance to 1,3-propanediol and altered production of acids. *Appl Environ Microbiol.* **61**:4413-4417
- ABBAD-ANDALOUSSI S, AMINE J, GERARD P, PETITDEMANGE H. 1998. Effect of glucose on glycerol metabolism by *Clostridium butyricum* DSM 5431. *J Appl Microbiol.* **84**:515-522
- BARGANZ 2003: persönliche Mitteilung von Prof. Barganz
- BARBIRATU F, GRIVET JP, SOURCAILLE P, BORIES A. 1996. 3-hydroxypropionaldehyde: An inhibitory metabolite of glycerol fermentation to 1,3-propanediol by *Enterobacterial* species. *Appl Environ Microbiol* **62**:1448-1451
- BARBIRATU F, CAMARAAS-CLARET C, GRIVET JP, BORIES A. 1995. Glycerol fermentation by a new 1,3-propanediol-producing microorganism: *Enterobacter agglomerans*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **43**:786-793
- BG Chemie. 1998. Sichere Biotechnologie. Eingruppierung biologischer Agenzien: Bakterien. Merkblatt B 006, 8/98, ZH 1/346. Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie, Jedermann-Verlag Dr. Otto Pfeffer oHG. Heidelberg
- BIEBL H. 1991. Glycerol fermentation of 1,3-propanediol by *C. butyricum*. Measurement of product inhibition by use of a pH-auxostat. *Appl Microbiol Biotechnol.* **35**:701-705
- BIEBL H, MARTEN S, HIPPE H, DECKWER WD. 1992 Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia. *Appl Microbiol Biotechnol.* **43**:786-793
- BIEBL H, MARTEN S. 1995. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol: Use of cosubstrates. *Appl Microbiol Biotechnol.* **44**:15-19
- BIEBL H, MENZEL K, ZENG AP, DECKWER WD. 1999. Microbial production of 1,3-propanediol. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**:289-297
- BOENIGK R, BOWIEN S, GOTTSCHALK G. 1993. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol in continous cultures of *Citrobacter freundii*. *Appl Microbiol Biotechnol* **38**:453-457
- CAMERON DC, ALTARAS NE, HOFFMAN ML, SHAW AJ. 1998. Metabolic engineering of propanediol pathways. *Biotechnol Prog.* **14**:116-125
- CANTONI C, MOLINAR MR. 1967. Investigations on the glycerol metabolism of *Lactobacilli*. *J Appl Bacteriol.* **30**:197-205
- CLAUDE S. 1996. Perspektiven Nachwachsender Rohstoffe in der Chemie. EIDERDANZ H, Herausgeber. 137-143. Verlag Chemie. Weinheim
- COGNIS 2002: Schriftliche Mitteilung zu Weltmarktpreisen Rohglycerin. Cognis, Düsseldorf
- CONNEMANN 1992: Verfahren zur kontinuierlichen Herstellung von C1 bis C4-Alkylestern... Patentschrift DE 4209779 vom 26.03.1992

- CHUAH H. 1996. „Corterra“ poly (trimethylenterephthalate) - a new polymeric fiber for carpets. *Chem Fibers Int.* **46**(6):427-428
- DECKWER WD. 1995. Microbial conversion of glycerol into 1,3-propanediol. *FEMS Microbiol Reviews.* **16**:143-149
- DuPont. 1999. Internet-Information.  
URL: <http://www.dupont.com/corp/whats-new/releases/99/991122.html>
- DuPont. 2000. Internet-Information.  
URL: <http://www.dupont.com/sorona/>
- DUPONT & GENENCOR 1998: Weltpatente WO 98/21339 und 98/21340
- ELM R, FALBE J, GELBKE HP. 1980. Propandiole. In: Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie. BARTHOLME E, Herausgeber. **19**:425-431. 4. neubearbeitete und erweiterte Auflage. Verlag Chemie. Weinheim
- FALBE J. (Hrsg.) 1995: Römpp Chemie Lexikon (9.Ausg.). Thieme Verlag, Stuttgart, 1995
- FELD + HAHN (1994) . Verfahren und Vorrichtung zur Herstellung von Rapsmethylester. Offenlegungsschrift DE 4238195 A1 vom 19.05.1994
- FORSBERG CW. 1987. Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other *Clostridium* species. *Appl Environ Microbiol.* **53**(4):639-643
- FREUND A. 1881. Ueber die Bildung und Darstellung von Trimethylenalkohol aus Glycerin. *Monatshefte für Chemie.* **2**:636-641
- GENENCOR 1998: Weltpatent WO 98/21341
- GONZALEZ B *et al.* 1994: Continuous glycerol production in a packed-bed bioreactor with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technol* **49**:3, 209-212
- GÜNZEL B. 1991. Mikrobielle Herstellung von 1,3-Propandiol durch *Clostridium butyricum* und adsorptive Aufarbeitung von Diolen. TU Braunschweig, Dissertation
- GÜNZEL B, YONSEL S, DECKWER WD. 1991 Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* up to a scale of 2 m<sup>3</sup>. *Appl Microbiol Biotechnol.* **36**:289-294
- HAYNIE SL, WAGNER LW 1996: Weltpatent WO 96/35799
- HBI. 1999. Glycerine Market Report Nr. 46, September 1999. HB International S.A., Montmorency, Frankreich. URL <http://www.hbi.fr>
- HEMING M. 1999. Glycerine Market Report. CTVO-NET workshop co-products: glycerine. 21.01.1999, Paris, Frankreich. URL: [http://www.dainet.de/fnr/ctvo/byproducts/heming\\_hbi.doc](http://www.dainet.de/fnr/ctvo/byproducts/heming_hbi.doc)
- HEYNDRIX M, DE VOS P, VANCANNEYT M, DE LEY J. 1991. The fermentation of glycerol by *C. butyricum* LMG 1212 t<sub>2</sub> and 1213 t<sub>1</sub> and *C. pasteurianum* LMG 3285. *Appl Microbiol Biotechnol.* **34**:637-642
- HIMMI EH, BORIES A, BARBIRATO F. 1999. Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *Biores Technol.* **67**:123-128
- HOMANN T, TAG T, BIEBL H, DECKWER W-D, SCHINK B. 1990. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol by *Klebsiella* and *Citrobacter* strains. *Appl Microbiol Biotechnol.* **33**:121-126

- LAFEND LA, NAGARAJAN V, NAKAMURA CE 1996: Weltpatent WO 96/35796
- Langbehn L 2000: DLG-Mitteilungen 09/2000, 2000, 61-63
- LÜTHI-PENG Q, DILEME FB, PUHAN Z, 2002. Effect of glucose on glycerol bioconversion by *Lactobacillus reuteri*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **59**:289-296
- LUTZ J. 1999. Optimierung der 1,3-Propandiol-Produktion aus Glycerin mit Einschlußimmobilisaten von *Klebsiella pneumoniae*. TU Braunschweig, Diplomarbeit
- NEIJSSSEL OM, HUETING S, CRABBENDAM KJ, TEMPEST DW. 1975. Dual pathways of glycerol assimilation in *Klebsiella aerogenes* NCIB 418. *Arch Microbiol.* **104**:83-87
- MENZEL K, ZENG AP, DECKWER WD. 1997. High concentration and productivity of 1,3-propanediol from continuous fermentation of glycerol by *Klebsiella pneumoniae*. *Enzyme Microb Technol.* **20**:82-86
- MICKELSON MN, WERKMAN CH. 1940 . Formation of trimethyleneglycol from glycerol by *Aerobacter*. *Enzymologika* **8**:252-256
- MURPHY D 1996: Engineering oil production in rapeseed and other oil crops. *Trends in Biotechnology*, **14**, 206-213
- MYERS D *et al.* 1997: Influence of invertase activity and glycerol synthesis and retention on fermentation of media with a high sugar concentration by *Saccharomyces cerevisiae*. *App Environ Microb* **63**:1, 145-150
- PAPANIKOLAOU S, RUIZ-SANCHEZ P, PARISSET B, BLANCHARD F, FICK M. 2000. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by newly isolated *Clostridium butyricum* strains. *J Biotechnol.* **77**:191-208
- PATIL SV *et al.*(1996): Oxygen transfer studies on the production of bioglycerol: A promising by-product of sugar industry. in: Sugar 2000 Symposium: Sugarcane: research towards efficient and sustainable production. CSIRO Div. Tropical Crops and Pastures; Brisbane; Australien; 301-303
- PETITDEMANGE E, DÜRR C, ABBAD-ANDALOUSSI S, RAVAL G. 1995. Fermentation of raw glycerol to 1,3-propanediol by new strains of *Clostridium butyricum*. *J Ind Microbiol.* **15**:498-502
- PFEFFER P, SAHM B. 1999. PDO to 3GT Economics – CONDUX consultants study; Condux-Online Literature, Newark, Delaware
- POTERA C. 1997. Genencor & Dupont create "green" polyester. *Genetic Engineering News* **17**:17
- REIMANN A, BIEBL H, DECKWER WD. 1996. Influence of iron, phosphate and methyl viologen on glycerol fermentation of *Clostridium butyricum*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **45**:47-50
- REIMANN A. 1997. Produktion von 1,3-Propandiol aus Glycerin durch *Clostridium butyricum* DSM 5431 und produkttolerante Mutanten. TU Braunschweig, Dissertation
- REIMANN A, ABBAD-ANDALOUSSI S, BIEBL H, PETITDEMANGE H. 1998a. 1,3-Propanediol formation with product-tolerant mutants of *Clostridium butyricum* DSM 5431 in continuous culture: productivity, carbon and electron flow. *J Appl Microbiol.* **84**:1125-1130

- REIMANN A, BIEBL H, DECKWER WD. 1998b. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* in continuous culture with cell recycling. *Appl Microbiol Biotechnol.* **49**:359-363
- RÖMPP LEXIKON 1999 Biotechnologie und Gentechnik, 2. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart/New York
- SAINT-AMANS S, PERLOT P, GOMA G, SOUCAILLE P. 1994. High production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* VPI 3266 in a simply controlled fed-batch system. *Biotechnol Lett.* **16**:831-836
- SAINT-AMANS S, SOUCAILLE P. 1995. Carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* grown in chemostat-culture on glucose-glycerol mixtures. *Biotechnol Lett.* **17**(2):211-216
- SCHÜTZ H, RADLER F. 1984. Anaerobic reduction of glycerol to 1,3-propanediol by *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus buchneri*. *Syst Appl Microbiol.* **5**:169-178
- SCHLIEKER M. 1999. Mikrobielle Umsetzung von Rohglycerin zu 1,3-Propandiol mit immobilisierten Zellen von *Clostridium butyricum* im kontinuierlichen Rührreaktor. TU Braunschweig, Diplomarbeit
- SKRALY FA. 1997. Metabolic engineering of an improved 1,3-propanediol fermentation. University of Wisconsin-Madison, Dissertation.
- SLININGER JP, BOTHAST RJ, SMILEY KL. 1983. Production of 3-hydroxypropionaldehyde from glycerol. *Appl Environ Microbiol* **46**:62-67
- TAG C. 1990. Mikrobielle Herstellung von 1,3-Propandiol. Universität Oldenburg, Dissertation
- VOGEL & NOOT 1992: Verfahren zur Herstellung von Fettsäureestern niederer Alkohole. Patentschrift WO 92/00268 vom 09.01.1992
- VOISENET E. 1914. Sur un ferment contenu dans les eaux agent déshydratation de la glycérine. *Ann Inst Pasteur.* **28**:807-818
- WERKMAN CH, GILLEN GF. 1932 . Bacteria producing trimethylene glycol. *J Bacteriol* **23**:167-182
- WITT U, ZENG A-P, DECKWER WD 1996: Patent DE 443261
- WITTLICH P, SCHLIEKER M, WILLKE T, VORLOP KD. 2000. Leistungssteigerung biotechnischer Prozesse durch neuartige Immobilisierungsmethoden für Biokatalysatoren am Beispiel der 1,3-Propandiol-Herstellung. 2. Workshop „Biokonversion nachwachsender Rohstoffe“, 14.-15.10.99. Schriftenreihe Nachwachsende Rohstoffe. Landwirtschaftsverlag Münster. **15**:112-131
- WITTLICH P. 2001. Biotechnische Herstellung von 1,3-Propandiol aus Glycerin mit immobilisierten Zellen von *Clostridium butyricum* NRRL B-1024 und thermophilen Mikroorganismen. TU Braunschweig, Dissertation
- ZENG AP, BIEBL H, SCHLIEKER H, DECKWER WD. 1993. Pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: Regulation of reducing equivalent balance and product formation. *Enzyme Microb Technol.* **15**:770-779
- ZENG AP, ROSS A, BIEBL H, TAG C, GÜNZEL B, DECKWER WD. 1994. Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation. *Biotechnol Bioeng.* **44**:902-911

ZENG AP. 1996. Pathway and kinetic analysis of 1,3-propanediol production from glycerol fermentation by *Clostridium butyricum*. *Bioproc Eng.* **14**:169-175

ZENG AP. 2001. Metabolic Engineering der mikrobiellen Produktion von 1,3-Propandiol  
Jahresbericht der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH 2001

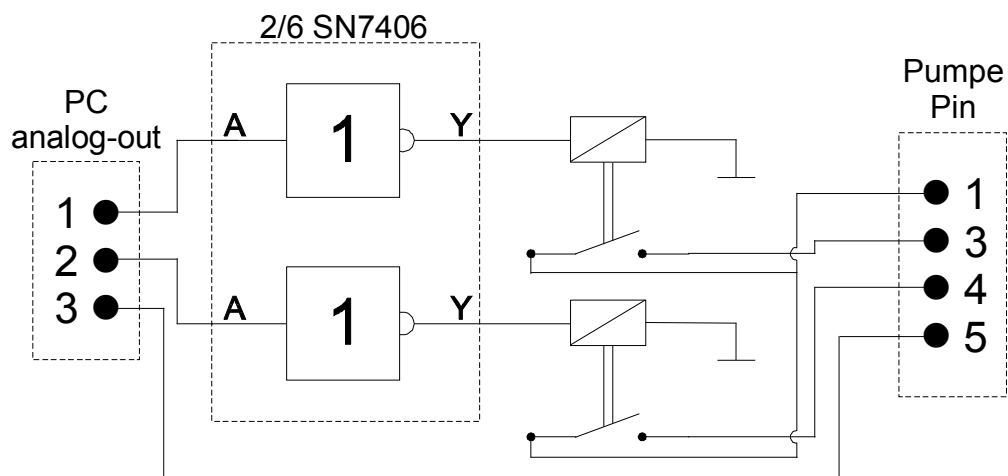
## 9 Anhang

**Tabelle 9-1:** Analyseergebnisse zu den untersuchten Rohglycerinwässern

Herkunft	Bezeichnung	Glycerin [%]	Asche [%]	Wasser [%]	Seife [%]	Blei [mg/L]	Kupfer [mg/L]	Nickel [mg/L]	Mangan [mg/L]	Eisen [mg/L]	Cobalt [mg/L]	Chrom [mg/L]	Natrium [mg/l]	Kalium [mg/l]	Methanol [g/kg]	pH-Wert	SZ [mg <sub>KOH</sub> /g]
Spaltung	AF1	13,1	0,2	84,6	2,1	4,4	0	0,18	0,27	4,02	5,1	0	116	43		6,5	0,6
	BF1	18,2	0,03	79,1	2,67	4,6	0	0,34	0,55	7,1	1,9	0	37	42		7	0,6
	BF2	38,4	0,3	59,1	2,2	0,18	0,02	0,32	0,02	1,2	0,06	0	14000	3,6		10	<0,1
	CF1	19,4	0,2	78,8	1,6	0,06	0	0	0,07	0,005	0	0	84	30		7	0,5
	CF2	78,4	0,5	19,2	1,9	0,1	0	0	0,13	9,8	0,07	0	830	200		7	2
	CF3	19,7	0,26	77,7	2,34	0	0,1	0,02	0,16	1,5	1,7	0	250	6,5		5,5	0,8
	CF4	19,7	0,26	77,7	2,34	0	0,1	0	0,25	2,1	1,5	0	10	5,5		4,5	0,8
Verseifung	AS1	12,7	13,8	74,8	0	0,21	0,51	2,4	0,23	2,9	1,5	0,25	71000	8,5		10,5	<0,1
	AS2	15,3	16,3	68,7	0	0,34	0,67	9,1	0,47	2,1	1,5	0,91	24000	11		7	<0,1
	BS1	9,6	12	78,2	0,2	0,1	0,26	0,03	0,2	11	1,2	0,02	62000	27		12	<0,1
	BS0	79,3	9,9	8,1	2,7	0	0,9	2,3	2	85	0,69	0,2	38000	203		9,5	<0,1
Umesterung	AD1	61	9,6	2,2	27,2	1,1	0	0	0,88	3,9	1,1	0	455	19000	112	10,5	0
	BD1	49,7	7	2,8	40,5	1,6	0	0	1,3	0,89	1,6	0	340	78000	82,5	9,5	0
	CD1	36,9	3,4	57,9	1,8	0,04	0,57	1,3	0,04	0,35	0,17	0,004	14000	3,6	1,37	7	0,3
	AA1	33,4	4,2	16,3	46,1	0,2	0,2	0,3	0,03	5	0,4	0	120	1400	96	11	2,6
	DD1	68,2	8,3	1,4	22,1	0,5	0,2	0,4	1,98	10,7	0,6	0,4	195	35350	159	11,5	0
	DD2	51,3	1,9	26,5	20,3	0	0	0,14	0,01	5,1	0,6	0,05	336	8700	196	7,5	1
	DD3	81	4,4	3,6	11	0,3	0,1	0,72	3,54	33,4	1,7	0,11	210	39500	0	6,5	3,4
	ED1	66,8	3,8	26,3	3,1	2,8	0,25	0	0,04	0,48	1	0	19000	5,6	74,2	7	13,8
	ED2	78,4	5,5	16	0,1	0,4	0	0,13	0,07	5,2	0,6	0,04	24000	11	0,3	7,5	5,5
	ED3	99,1	1,2	0,6	0	2,1	0	0	0,07	2	0,86	0	9000	4	0	7,3	3



## Anhang



**Abbildung 9-1:** Schaltung zur Ansteuerung von Ecoline VC-360 Pumpen mittels dreier analoger 0-5 Volt Signale



## 9.1 Schaltpläne DasyLab®

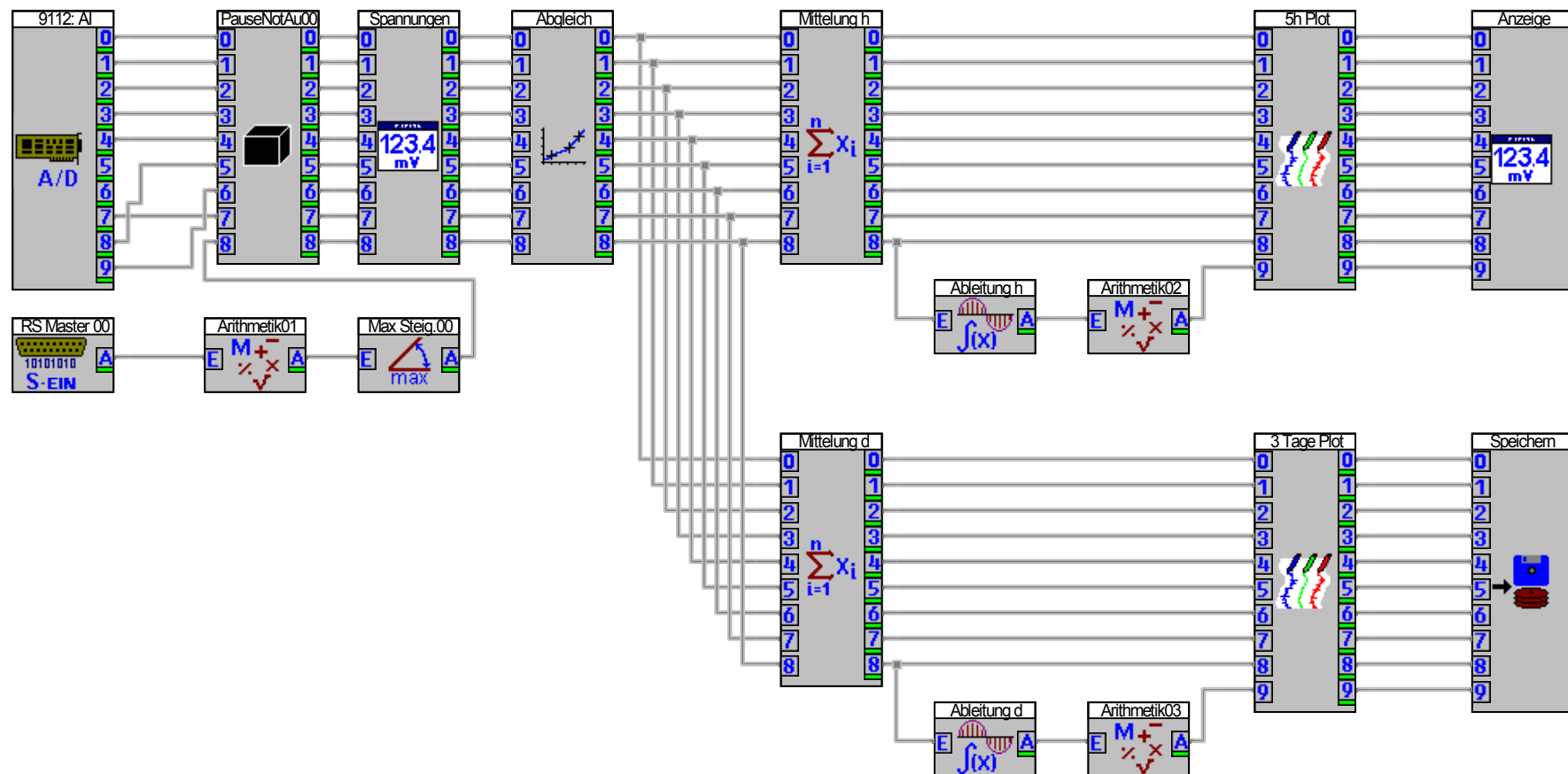
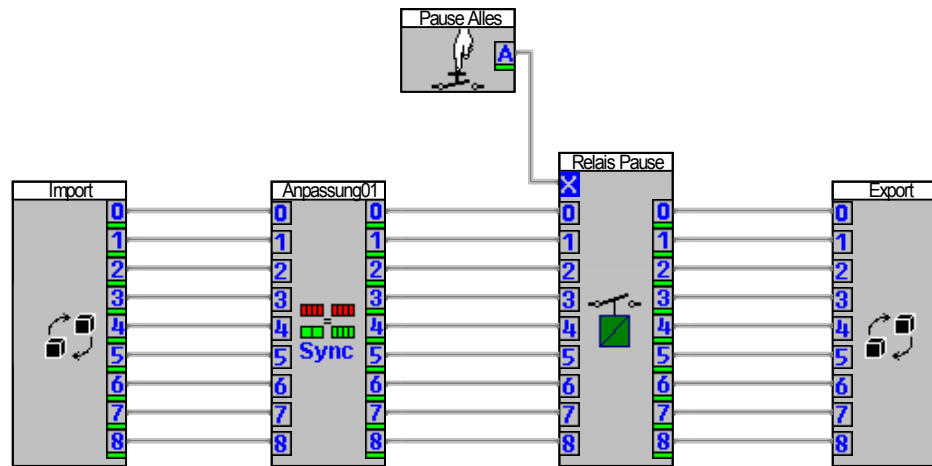
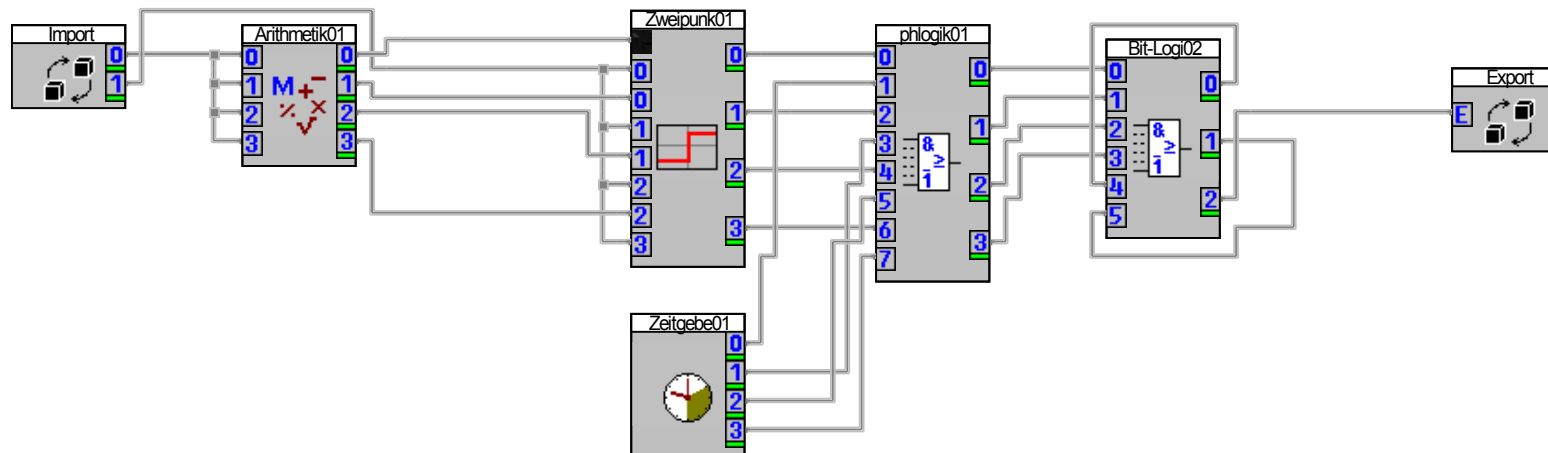


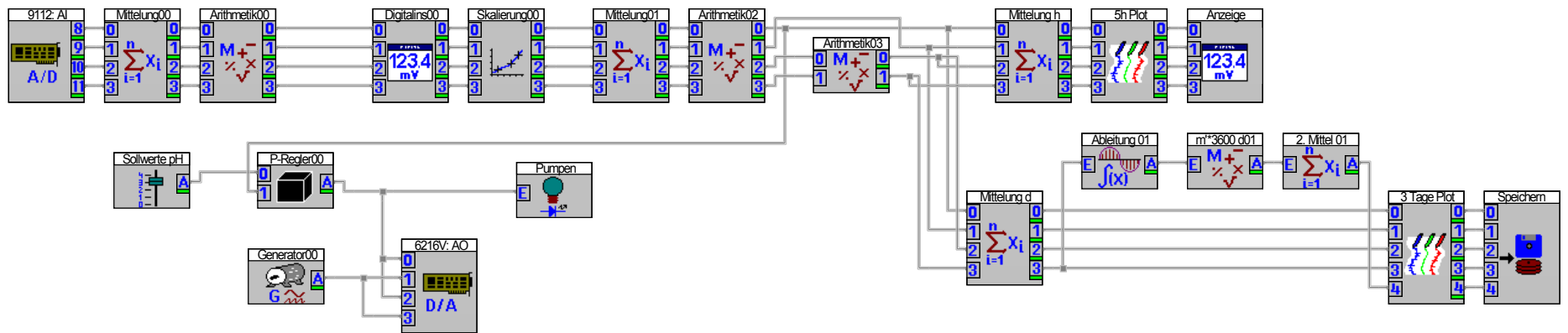
Abbildung 9-2: DasyLab®-Schaltbild für den Fermenter mit Meredos-Komponenten



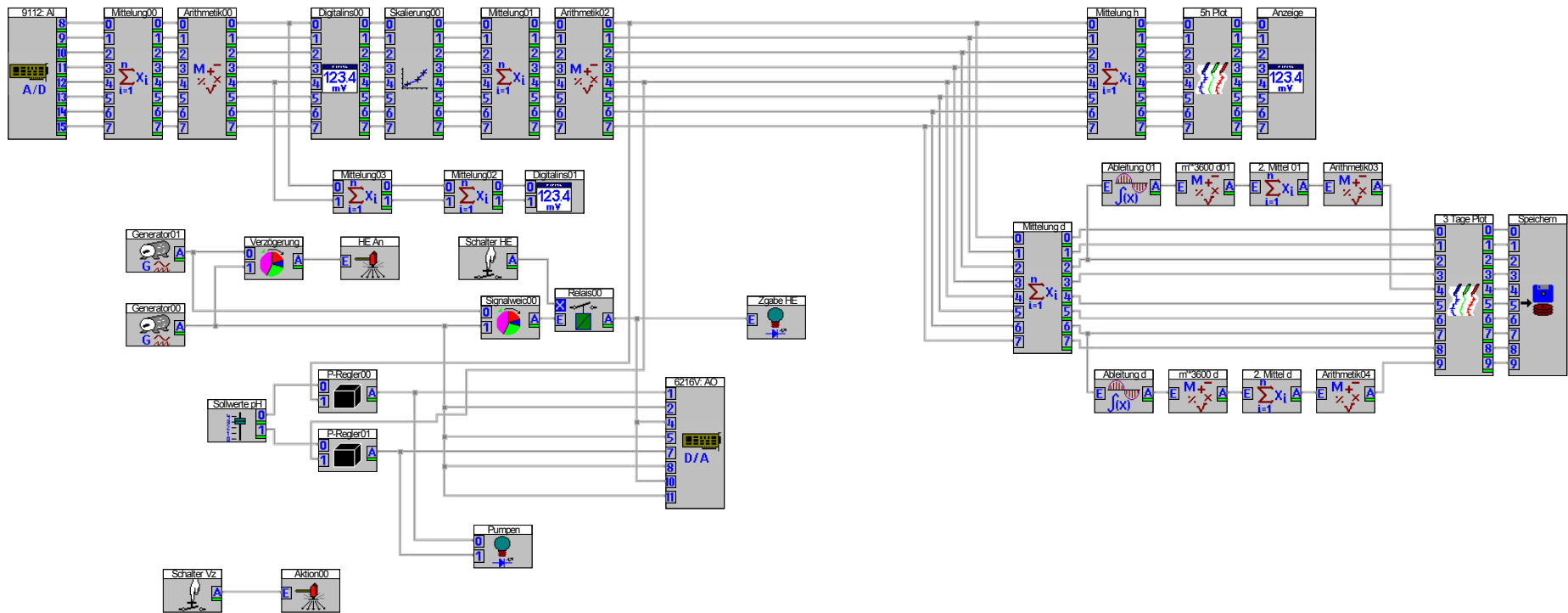
**Abbildung 9-3:** Blackbox-Modul PauseNotAu00



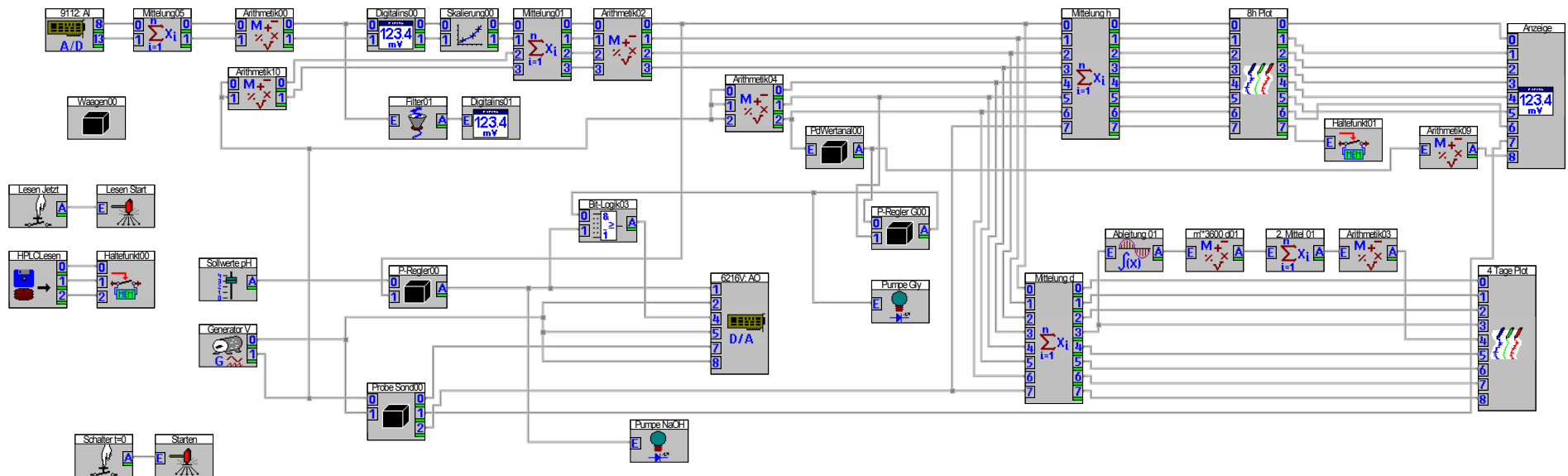
**Abbildung 9-4:** Blackboxmodul P-Regler



**Abbildung 9-5:** Fementerschaltbild für den computergesteuerten 1-Liter-Fermenter

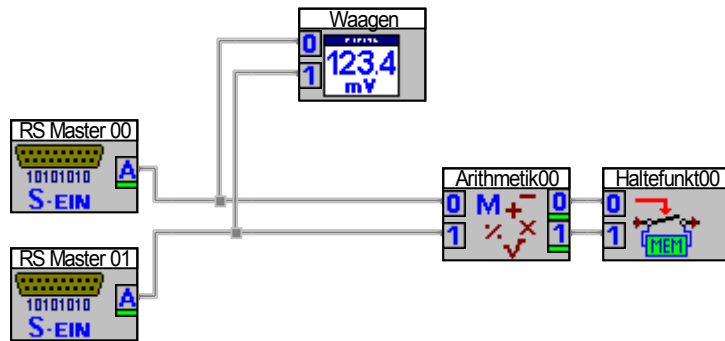


**Abbildung 9-6:** Dasylab®-Schaltbild für das 1-Liter-Doppel-Fermentersystem

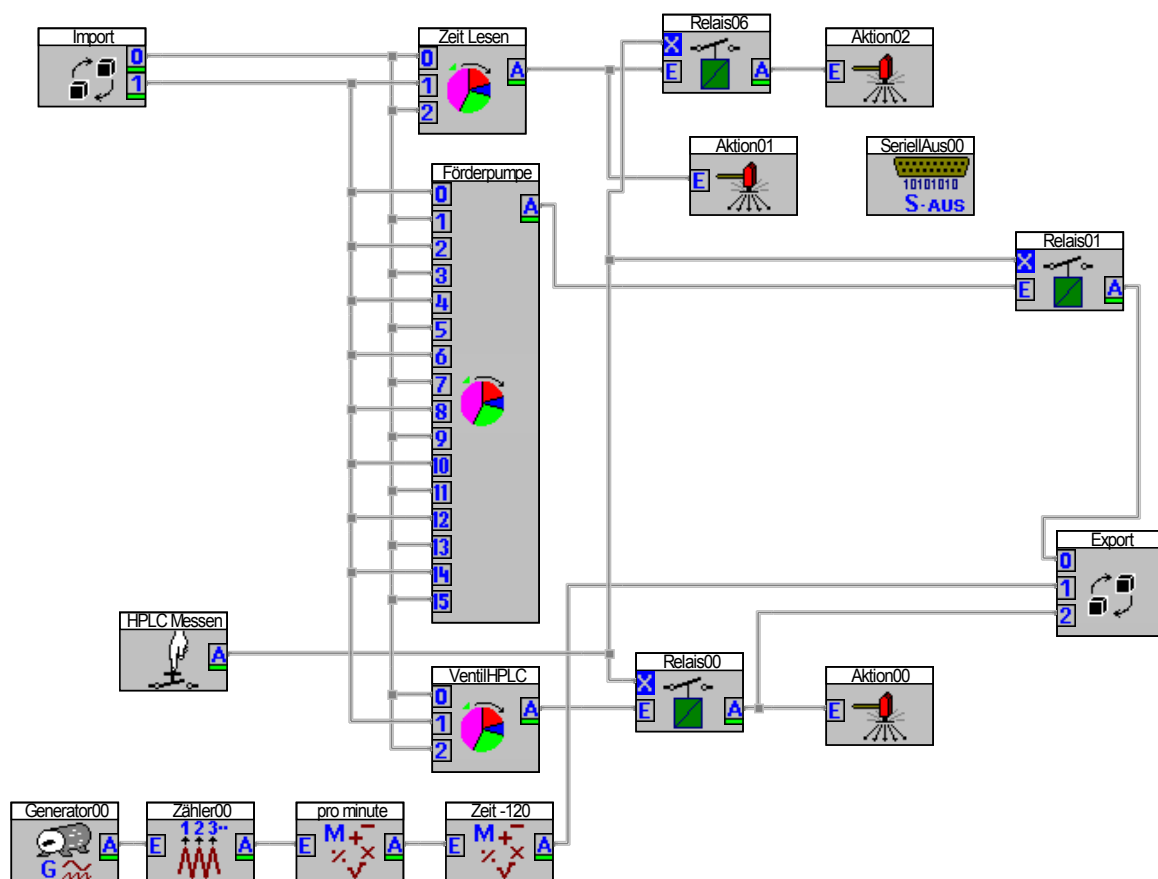


**Abbildung 9-7:** Dasylab®-Schaltbild für den Fermenter mit online-HPLC und Einlesen der HPLC-Ergebnisse in Dasylab®

## Anhang

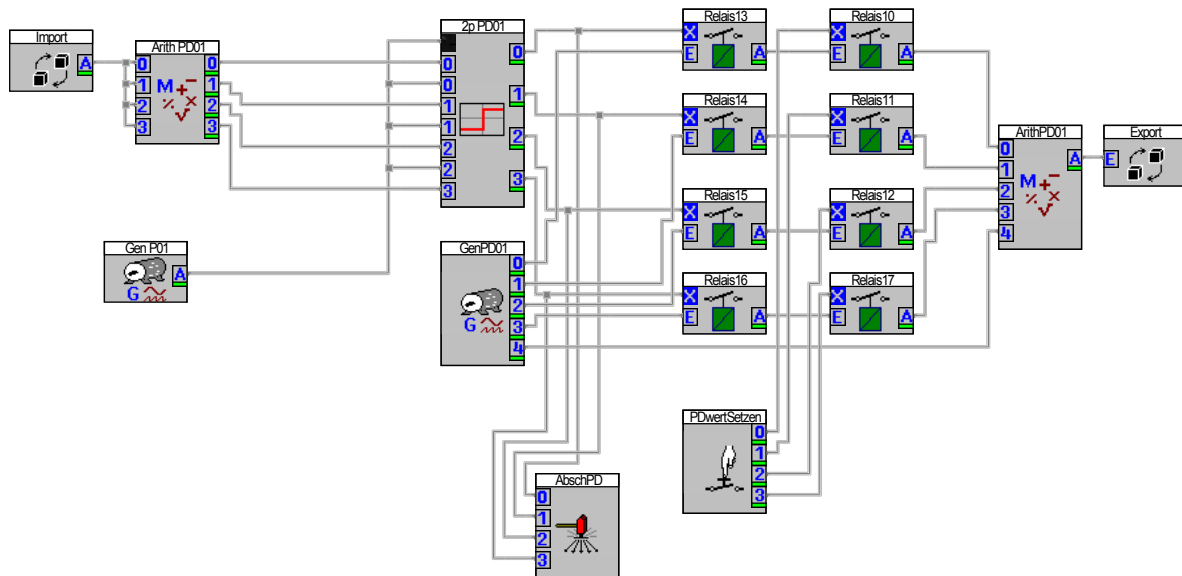


**Abbildung 9-8:** Blackbox-Modul Waagen

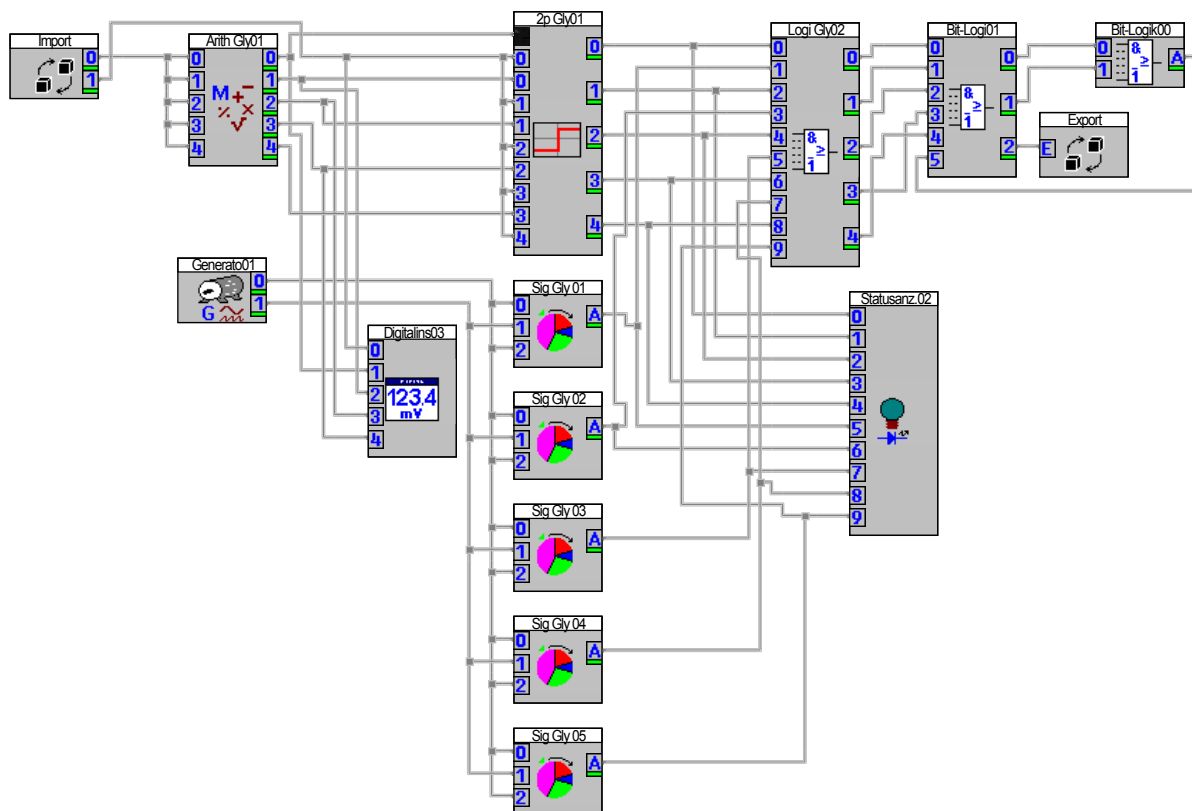


**Abbildung 9-9:** Blackbox-Modul ProbenSonde

## Anhang

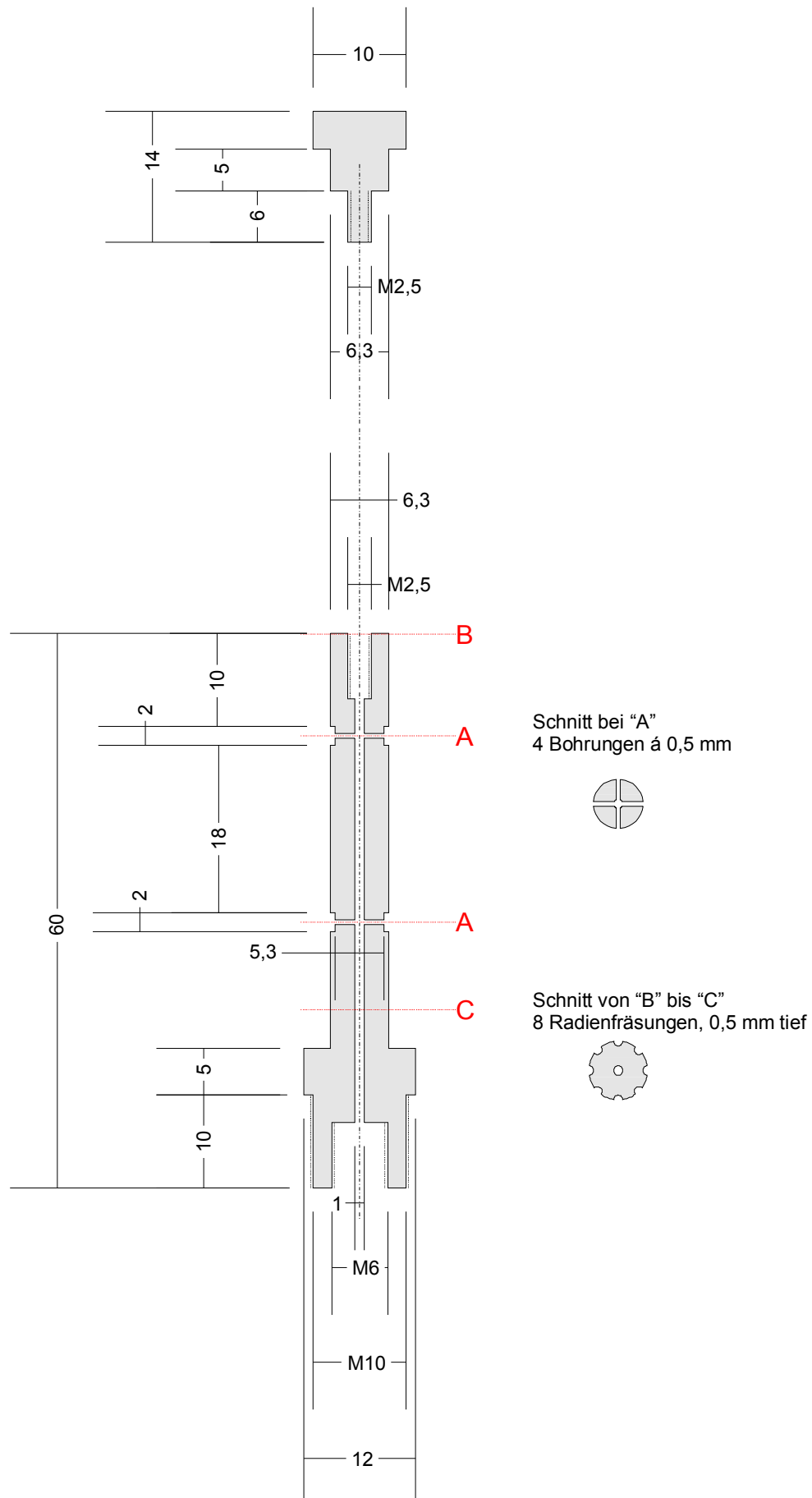


**Abbildung 9-10:** Blackbox-Modul PDWertanalyse



**Abbildung 9-11:** Blackbox-Modul P-Regler Glycerin

# Anhang



**Abbildung 9-12:** technische Zeichnung des PEEK-Körpers der Probenahmesonde



## 9.2 Datentransfer von Chromgate® nach Dasylab®

### 9.2.1 Beispiel für eine Exportdatei der Software Chromgate®

Report Channel # Records

ESTD concentrationDetector 36

Date	Time	Sample Id	File Name	Method Name	User Name	Vial	Volume	Autosampler Program	Phosphat	Glycerine	1,3-Propandiol
28.01.02	16:25:34	RB 41 01	C:\RB 41 01.dat	C:\auto20.met	System	N/A	5,00	(None)	1,959	209,773	0,000
28.01.02	16:52:00	RB 41 02	C:\RB 41 02.dat	C:\auto20.met	System	N/A	5,00	(None)	1,879	207,187	0,394
28.01.02	18:52:00	RB 41 03	C:\RB 41 03.dat	C:\auto20.met	System	N/A	5,00	(None)	1,889	206,330	0,358
28.01.02	20:52:00	RB 41 04	C:\RB 41 04.dat	C:\auto20.met	System	N/A	5,00	(None)	1,865	206,257	0,452

## 9.2.2 Beispiel für eine Dasylab<sup>®</sup>-Datei

DASYLab - V 5.00.00  
Schaltbildname : RBMS7  
Aufgenommen am : 14.07. 0, 12:31:59  
Blocklaenge : 1  
Delta : 120.000000 sec.  
Kanalzahl : 3  
Phosphat [] Glycerin [] PD []  
1,298 75,856 26,483

## 9.2.3 Programm zum Konvertieren der HPLC-Analyseergebnisse in das Dasylab<sup>®</sup>-Dateiformat

```
program HPLC2DasyLab;

uses Windows, SysUtils, Classes, SMTPSend, MIMEMess;

{$R *.RES}

PROCEDURE Delay(mSecs:LONGINT);
VAR firstTickCount : LONGINT;
    deltaTickCount : LONGINT;
BEGIN
    firstTickCount:=GetTickCount;
    REPEAT
        deltaTickCount:=GetTickCount-firstTickCount;
    UNTIL (deltaTickCount>=mSecs) OR
        (deltaTickCount<0);
END;

CONST valNUMBER = 3;
    posPO4 = 3;
VAR inName : STRING;
    outName: STRING;
    f : Textfile;
    s : STRING;
    valS : ARRAY[1..10] OF STRING;
    valR : ARRAY[1..10] OF REAL;
    i,ii : INTEGER;
    t : TStringList;
    MIME : TMIMEMess;
```

## Anhang

```
sFrom : STRING;
sTo   : STRING;
sAdr  : STRING;
check : INTEGER;
PO4   : REAL;
BEGIN
  inName:=PARAMSTR(1); {xxx.ESTDConc}
  outName:=PARAMSTR(2); {Test}

  IF PARAMCOUNT >= 3 THEN BEGIN
    s:=PARAMSTR(3);
    VAL(s,PO4,check);
    IF check<>0 THEN PO4:=2;
  END ELSE PO4:=2;

  IF PARAMCOUNT >= 4 THEN
    sTo:=PARAMSTR(4)  {Zielmailadresse}
  ELSE sTo:='xxx@xxx.de';

  Delay(20000);

  {!}IF NOT FileExists(inName) THEN EXIT;

  AssignFile(f,inName);
  Reset(f);
  REPEAT
    READLN(f,s);
  UNTIL EOF(f);
  WHILE POS(' BDL',s)>0 DO DELETE(s,POS(' BDL',s),4);
  FOR i:=1 TO valNUMBER DO BEGIN
    valS[i]:='';
    WHILE s[LENGTH(s)]<>' ' DO BEGIN
      valS[i]:=s[LENGTH(s)]+valS[i];
      DELETE(s,LENGTH(s),1);
    END;

    FOR ii:=LENGTH(valS[i]) DOWNTO 1 DO BEGIN
      IF valS[i][ii]='.' THEN valS[i][ii]:='.';
      IF NOT (valS[i][ii] IN ['0'..'9','.']) THEN DELETE(valS[i],ii,1);
    END;
    VAL(valS[i],valR[i],check);

    WHILE s[LENGTH(s)]=' ' DO DELETE(s,LENGTH(s),1);
  END;
  CloseFile(f);

  i:=1;
```

## Anhang

```
REPEAT
  STR(i,s);
  WHILE LENGTH(s)<4 DO s:='0'+s;
  INC(i);
UNTIL NOT FileExists(outName+s+'.ASC');

IF valR[posPO4]<PO4*0.8 THEN BEGIN
  IF valR[posPO4]<>0 THEN BEGIN
    FOR i:=valNUMBER DOWNT0 1 DO
      IF i<>posPO4 THEN valR[i]:=valR[i]/valR[posPO4]*PO4;
    END ELSE BEGIN
      valR[posPO4]:=3.0;
      valR[2]:=32.0;
      valR[1]:=15.0;
    END;
    AssignFile(f,outName+s+'.TXT');
    REWRITE(f);
    Writeln(f,valS[posPO4]+' fehlerhaft');
    CLOSE(f);
  END;

  IF (valR[1]=0) OR
    (valR[2]=0) OR
    (valR[3]=0)
  THEN BEGIN
    valR[3]:= 3.0;
    valR[2]:=32.0;
    valR[1]:=15.0;
  END;

  AssignFile(f,outName+s+'.ASC');
  REWRITE(f);
  Writeln(f,'DASYLab - V 5.00.00');
  Writeln(f,'Schaltbildname : RBMS7');
  Writeln(f,'Aufgenommen am : 14.07. 0, 12:31:59');
  Writeln(f,'Blocklaenge   : 1');
  Writeln(f,'Delta       : 120.000000 sec. ');
  Writeln(f,'Kanalzahl    : 3');
  Writeln(f,'Phosphat [] Glycerin [] PD []');

  FOR i:=valNUMBER DOWNT0 1 DO BEGIN
    STR(valR[i]:8:3,valS[i]);
    WHILE (valS[i]<>'') AND (valS[i][1]=' ') DO DELETE(valS[i],1,1);
    valS[i][POS('.',valS[i])]:=',';
    WRITE(f,valS[i],#9);
  END;
END;
```

## Anhang

```
WRITELN(f);
```

```
CloseFile(f);
```

```
{you must create object for MIME message}
```

```
t:=TStringList.Create;
```

```
t.Sorted:=FALSE;
```

```
FOR i:=valNUMBER DOWNT0 1 DO t.Add(valS[i]);
```

```
sFrom:='xxx@xxx.de';
```

```
sAdr:='xxx@xxx.xxx.de';
```

```
MIME:=TMIMEMess.Create;
```

```
try
```

```
  {set headers for message}
```

```
  MIME.header.from:=sFrom;
```

```
  MIME.header.Tolist.add(sTo);
```

```
  MIME.header.subject:=DateToStr(Date)+' '+TimeToStr(Time);
```

```
  MIME.AddPartText(t); {add text part}
```

```
  MIME.EncodeMessage; {compose message}
```

```
  MIME.FinalizeHeaders;
```

```
  {now we may send it to SMTP server... by SMTPSend unit...}
```

```
  SendToRaw(sAdr,sTo,'postausgang.fal.de',MIME.Lines,"");
```

```
finally
```

```
  MIME.Free; {destroy MIME object}
```

```
end;
```

```
end.
```



## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Vorlop danke ich für die Überlassung des Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Sein ständiges Interesse an der praktischen Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft, seine guten Ideen und seine Fähigkeit die richtigen Fragen zu stellen haben mir sehr geholfen.

Herrn apl. Prof. Dr. Siegmund Lang danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Mein Dank gilt auch der wertvollen Mitarbeit von Frau Ilona Koschick, Herrn Marc Schlieker, Herrn Tobias Meyer, Herrn Dr. Peter Wittlich, Herrn Dr. Ulrich Jahnz und Herrn Dr. Thomas Willke. Ohne ihr Engagement und ihre Unterstützung wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Für das zur Verfügung stellen von Rohglycerinproben danke ich den Prignitzer Chemie Werken in Wittenberge, Brandenburg, der Firma Mega, Stráž pod Ralskem, CZ und Herrn Dr. Zahn vom Institut für Umweltforschung Schlieben für die Beschaffung der vielen unterschiedlichen Rohglycerinproben.

Herrn Prof. Barganz danke ich für die Berechnungen zur Rentabilität biotechnologischer 1,3-Propanediol Produktion.

Für die Durchführung von Glycerinanalysen danke ich Herrn Dr. Jürgen Fleckenstein vom Institut für Pflanzenernährung der FAL, Herrn Dr. Zehl (Institut für Umweltforschung Schlieben) und Frau Hempel (Prignitzer Chemie Wittenberge).

Der Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Schließlich gilt mein besonderer Dank meinen Eltern, die mir die Ausbildung ermöglicht haben.